

Über elektrophoretische Untersuchungen
am hypertrophischen Kaninchenmyokard

Claus-Albrecht Strenge

1960

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. S e i t z

ÜBER ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN AM
HYPERTROPHISCHEN KANINCHENMYOKARD

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claus-Albrecht Strenge
aus München

München 1961



Dekan: Professor Dr. K. Kolle
Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Nowy
Korreferent: Professor Dr. W. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 5. April 1960



Das gesunde Herz vermag sich Beanspruchungen, die über das normale Maß hinausgehen, anzupassen. Ein solcher Anpassungsvorgang auf lange Sicht ist die Hypertrophie, die dann entsteht, wenn das Herz mit erhöhter Faserspannung arbeiten muß. Die Hypertrophie ist mit tiefgreifenden strukturellen Veränderungen verbunden, vor allem einer Verdickung und Längenzunahme der Fasern. Die morphologischen Umbauvorgänge wurden im letzten Jahrzehnt insbesondere von Linzbach eingehend untersucht.

Nowy und Mitarbeiter haben neuerdings beim Kaninchenherzen gezeigt, daß die Hypertrophie auch mit Veränderungen der chemischen Zusammensetzung des Myokards verbunden ist; z. B. in der Nucleinsäuren- und Eiweiß-Zusammensetzung. Es wurde gezeigt, daß im hypertrophischen Myokard die Konzentration der kontraktilen Proteine signifikant zunimmt, offenbar auf Kosten anderer löslicher, nicht kontraktiler Proteine.

Wir haben nun den Versuch unternommen, festzustellen, ob solche Unterschiede in der Eiweißzusammensetzung zwischen normalem und hypertrophischem Herzmuskel sich auf elektrophoretischem Wege aufzeigen lassen.

Die ersten Untersuchungen von Proteinen im elektrischen Feld wurden im Jahre 1899 von Hardy, zitiert nach Dubuisson, gemacht. Im Jahre 1930 veröffentlichte Tiselius, inspiriert durch seinen Lehrer Svedberg, eine ausgezeichnete Methode zur makroelektrophoretischen Untersuchung von Eiweißkörpern. Diese Methodik wird heute noch, wenn auch häufig in leicht modifizierter Weise, in vielen Laboratorien angewendet. Das Hauptaugenmerk war zunächst jahrelang auf die Serumelektrophorese gerichtet, und erst zu Beginn der vierziger Jahre erschienen Arbeiten, die den Muskel einer elektrophoretischen Untersuchung unterzogen: Bate-Smith 1940 "Purific. of Zymohexase", Bailly 1942, Mehl und Sexton "Extrakte von quergestreiften Rattenmuskel und Rattenopticus".

Nachdem die Muskelphysiologie und -biochemie durch die großen Schulen von Mayerhof, Hill, Weber und Szent-Györgyi starken Auftrieb erhalten hatten und sich immer mehr neue Erkenntnisse zeigten, lag es nahe, die Muskelproteine auch auf elektrophoretischem Wege zu analysieren.

Solche Untersuchungen wurden insbesondere von Dubuisson und Mitarbeitern seit 1945 am Skelettmuskel ausgeführt. Diese Arbeiten sind auf eine große Zahl angestiegen. Erst später wandte sich das Interesse auch dem Herzmuskel zu. Elektrophoretische Untersuchungen von Salzextrakten aus Myokard wurden insbesondere von Dubuisson, Jacob, Haan, Cruck, Distèche und Nowy bei verschiedenen Tierspezies ausgeführt. Es handelt sich bei diesen Untersuchungen in erster Linie um grundlegende Fragen nach der Eiweißzusammensetzung des normalen Myokards im Vergleich zum Skelettmuskel und zur Zusammensetzung verschiedener Herzabschnitte. Im folgenden wird die Frage untersucht, ob mit der Methode der Elektrophorese Unterschiede zwischen normalem und hypertrophischem Kaninchenmyokard festgestellt werden können.

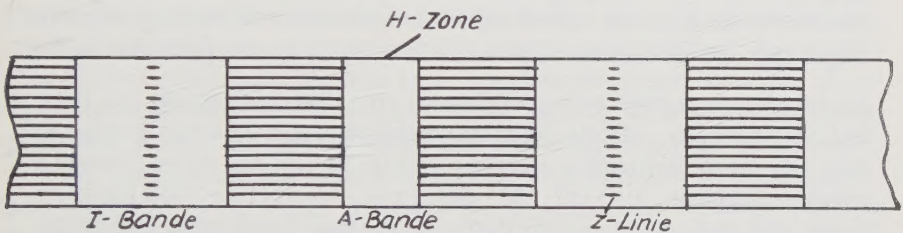
Muskelstruktur und Eiweißkörper

Wenn man sich mit der Untersuchung von Muskelproteinen befaßt, so ist es zunächst erforderlich, sich ein Bild, so weit das heute möglich ist, vom allgemeinen Aufbau der quergestreiften Muskulatur zu machen.

Die Muskelfaser besteht aus Sarkoplasma, einer sehr großen Anzahl von Fibrillen, die faserparallel angeordnet sind, Kern und Sarkolemm. Jede Muskel-

fibrille besteht wiederum aus 400 - 2000 nur elektronenoptisch darstellbaren Filamenten, die parallel zum Verlauf der Fibrille gelegen sind. Das Gesamtvolumen der Filamente einer Fibrille ist noch strittig. Ashley und Baker haben die Hypothese aufgestellt, daß die achsenparallel angeordneten Filamente ausschließlich die Wand einer Muskelfibrille auskleiden, wenn man sich letztere als Rohr vorstellt. Szent-Györgyi und andere Autoren vertreten die Ansicht, daß der ganze Fibrillenabschnitt von Filamenten ausgefüllt ist.

Die Querstreifung entsteht hauptsächlich durch die Aneinanderreihung der dunklen klar doppelbrechenden A-Bande (anisotropisch) und der helleren nicht doppelbrechenden I-Bande (Isotropisch).



Eine weitere Querunterteilung entsteht durch die Z-Streifen, die man als Grundmembran bezeichnet. Sie ist an das Sarkolemm angeheftet und für den Durchtritt der Myofibrillen siebartig durchlöchert. Hierdurch ist eine parallele Fibrillenordnung gewährleistet, die auch durch querangreifende Kräfte nicht gestört wird. Im ruhenden Muskel ist die A-Bande länger als die I-Bande (6 : 4). Die Entstehung der Querstreifung wird durch die verschiedene Verteilung von Substanzen erklärt. Die A-Bande ist z. B. reich an Salzen (Ionen), woraus wahrscheinlich die dunklere Farbnuance resultiert, während die I-Bande reicher an Phosphaten und Adeninderivaten sein soll. Bei der Kontraktion (isometrisch) verkürzt sich die A-Bande um 18 %; die I-Bande dagegen dehnt sich um 28 %. Bei extremer isotonischer Kontraktion scheint sich auch die I-Bande zu verkürzen.

Neben A- und I-Banden können elektronenmikroskopisch noch weitere Querunterteilungen nachgewiesen werden.

Die Herzmuskulatur unterscheidet sich in der Ultrastruktur nur sehr wenig vom Skelettmuskel. Die innenständigen Kerne beim Herzmuskel zeigen eine gewisse Ähnlichkeit mit der Kernanordnung der glatten Muskulatur. Der Herzmuskel nimmt eine Mittelstellung zwischen quergestreifter Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur ein. Alle Herzmuskelfasern sind durch spitzwinklige Anastomosen miteinander verbunden. Neuerdings wird bestritten, daß es sich um ein Syncytium

handelt, man ist der Auffassung, daß durch die Glanzstreifen die Unterteilung in Zellterritorien erfolgt. Der Herzmuskel zeigt im Lichtmikroskop eine Querstreifung, die aber nicht so ausgeprägt ist, wie beim Skelettmuskel. Diese Tatsache hat man mit dem Sarkoplasma- und Myoglobinreichtum der Herzmuskelfaser zu erklären versucht. Betrachtet man den Herzmuskel mit dem Phasenkontrastmikroskop, so stellt man fest, daß er besonders viele Mitochondrien enthält. Sie sind regelmäßig im Zytoplasma zu finden, zeigen Stäbchenform und sind 1μ breit und 5μ lang. Der hohe Mitochondriengehalt des Myokards hängt mit dem intensiven Stoffwechsel dieses Gewebes zusammen. In den Mitochondrien sind die Fermente der Oxydation und die des Zitronensäurecyclus sowie ATP als Energiespeicher besonders angereichert. Man glaubt, daß die Fermente in den Mitochondrien in bestimmter Reihenfolge aneinandergelagert und an elektronenoptisch sichtbaren Strukturen gebunden sind.

Im submikroskopischen Aufbau ergibt sich eine Übereinstimmung von Herz- und Skelettmuskel, wie die elektronenoptischen Untersuchungen gezeigt haben. Die im Lichtmikroskop sichtbare Fibrille ist also aus vielen Elementarfibrillen aufgebaut. Hürthl 1931 und Frey-Wyssling 1938 haben erkannt, daß nicht die Elementarfibrille die kleinste funktionelle Einheit ist, sondern langgestreckte Makromoleküle, die man treffender als Linear- oder Faserproteine bezeichnet. Diese Faserproteine sollen kein unveränderliches Produkt sein, sondern ein reversibel dissoziierendes Komponentensystem, in dem Elementarfibrillen zu Mizellen gebündelt sind. Zahlreiche Nebenvalenzbindungen geben der Mizelle ein relativ festes Gefüge. Diskutiert werden hier "weiche Bindungen" u. a.: Wasserstoffbindungen, gleichartige Wasserstoffbindungen zwischen Säureamidgruppen und van der Waal'sche Kräfte. H. H. Weber hat gezeigt, daß das Faserprotein der Elementarfibrille mit dem Myosin identisch ist, da künstliche Myosinfäden mit Fibrillen Eigendoppelbrechung und Röntgendiagramme gemeinsam haben. Zwischen den Fibrillen der Herzmuskelfaser liegen die vorerwähnten Mitochondrien und das mikroskopisch amorphe Sarkoplasma.

Goldenberg erkannte bereits 1866, daß die Muskelfasern des rechten Herzens dünner als die des linken sind. Sie sind um so viel dünner als es der Gewichts-differenz der Kammern entspricht.

Eine Sonderstellung in funktioneller und chemischer Hinsicht nimmt das Reizleitungssystem des Herzens ein, das sich durch besonders hohen Plasma- und Glykogengehalt sowie eine geringe Fibrillenzahl auszeichnet.

Das hypertrophische Herz

Anatomisch gesehen imponiert die Hypertrophie als Massenzunahme des Herzmuskels. Eine Massenzunahme entsteht durch

1. Hypertrophie der Faser (jede Faser wird größer und dicker),
2. Hyperplasie, d.h. die Anzahl der Fasern vermehrt sich,
3. eine Kombination der beiden vorher angeführten Möglichkeiten.

Der Zusammenhang zwischen Klappenfehler und Herzhypertrophie ist schon sehr lange bekannt. So sah schon Corvisart in der Herzhypertrophie eine Antwort des Organismus auf die gestörte Herzdynamik. Cohnheim und Rosenbach gingen denselben Weg und bauten die Ansicht aus, daß die Herzhypertrophie funktionell eine rein mechanische Arbeitshypertrophie sei. Irgendwelchen anderen physiologischen oder pathologischen Momenten, die evtl. zu einer Massenzunahme des Herzmuskels führen können, wurde keine Beachtung geschenkt. Nach Cohnheim haben alle Muskelhypertrophien die gleiche Ursache, nämlich daß irgendein Dehnungsreiz mit verstärkter Kontraktionsarbeit beantwortet wird. Roux definierte die Hypertrophie: "Durch die Beanspruchung der Leistung wird ein Wirkungsreiz ausgeübt auf die arbeitende Substanz". Hasenbroek sieht in der Hypertrophie eine durchaus physiologische Antwort des Herzmuskels, die erst "durch die gegenüber dem normalen stark erhöhten Funktionen des großen Kreislaufs pathologisch wird". Bohnenkamp hatte als erster Bedenken gegen die von Cohnheim aufgestellte Theorie, nachdem Untersuchungen von A. W. Meyer gezeigt hatten, daß allein durch länger andauernde Spannung eine Hypertrophie - allerdings am Skelettmuskel - erzeugt werden konnte; d.h. ohne jegliche vermehrte Arbeitsleistung. Die Versuche von A. W. Meyer wurden noch von Froboese bestätigt. Der seit Jahren bestehende Begriff von Arbeit und Leistung wurde durch das Wort "Spannungszunahme" allein ersetzt.

Jüngere Untersuchungen, so z. B. von Linzbach und Büchner sehen die unmittelbaren Ursachen des "harmonischen" hypertrophischen Wachstums der Herzmuskelfaser in

1. der relativen Oberflächenvergrößerung nach Überdehnung,
2. der vermehrten Coronardurchblutung.

Beim Herzen kommt es nach Linzbach nicht auf die Herzleistung, d.h. der in einer bestimmten Zeiteinheit geleisteten Arbeit an. Sie kann u. a. durch die Frequenz variiert werden; Frequenzsteigerung führt ihrerseits aber nie zu einer Hypertrophie. Die Herzmuskelhypertrophie hat ihre Ursache in der erhöh-

ten Arbeit des einzelnen Herzschlages. Daher hat man den Ausdruck "Schlagleistung" geprägt. Herzarbeit ist gleich dem Produkt des gegen einen bestimmten Druck geförderten Blutvolumen plus dem sogenannten Beschleunigungsfaktor.

Es gibt folgende drei Möglichkeiten, die eine Hypertrophie nach sich ziehen:

1. Erhöhung des Widerstandes im arteriellen System
2. Erhöhung des Schlagvolumens (Klappenfehler)
3. Verkürzung der Auswurfzeit

Die Steigerung des Herzstoffwechsels infolge Mehrbelastung löst eine chronische Mehrdurchblutung des überbeanspruchten Herzens aus. Diese günstige Ernährung ist wiederum Vorbedingung für ein Wachstum des Muskels. Bei mangelnder Coronardurchblutung kann trotz Überdehnung das harmonische Wachstum der Faser ausbleiben und eine Dilatation oder Hypertrophie mit Dilatation als Folge eintreten.

Im einzelnen hat nach H. Straub ein vermehrter venöser Zufluß ein größeres diastolisches Volumen zur Folge, was einer hohen Anfangsspannung gleichzusetzen ist. Bei der Druckerhöhung haben wir als Folge einen systolischen Rückstand, der dann auch das diastolische Volumen vermehrt. Diese vergrößerte Anfangsspannung hat eine tonogene Dilatation zur Folge. Tonogene Dilatation ist der funktionelle Anpassungsvorgang eines gesunden Herzens an vermehrte Druck- oder Volumenarbeit = kompensatorische oder aktive Dilatation. Sie ist Schrittmacher der Hypertrophie, wie Kirch angibt. Myogene Dilatation = passive oder Stauungsdilatation. Sie soll durch Schwäche und Erkrankung zustande kommen. Wir sehen z. B. bei einem Klappendefekt oder einem Hochdruck häufig erst eine Anpassungsdilatation und dann später durch die Myokardschädigung eine Schwachedilatation. Arbeitet nun das Herz längere Zeit mit vermehrter Leistung innerhalb der oben erwähnten Anpassungsbreite, so kommt es bald zu einer dauerhaften strukturellen Anpassung, genannt Hypertrophie. Nach Krehl ist ein hypertrophiertes Herz auf ein höheres Arbeitsniveau eingestellt.

Nun ist nicht in jedem Fall Hypertrophie gleich Hypertrophie zu setzen. Oberhalb des kritischen Herzgewichtes Linzbach zeigen sich 2 Grundtypen der Massenzunahme des Herzmuskels neben Mischformen.

1. die sog. konzentrische Hypertrophie
2. die sog. exzentrische Hypertrophie

Bei der ersten Form entspricht das Verhältnis der lichten Weite der Kammer zur Wanddicke der Norm. Ferner finden wir hier keine starke Verdickung der Muskelfaser, sondern eine Faservermehrung. Diese numerische Hyperplasie kommt wahrscheinlich durch Längsteilung zustande, durch Einriß der Anastomosenwinkel. Diese Form ist günstig, da die Muskelfasern relativ dünn bleiben und somit die Grenzschichtdicke nicht so bald erreicht wird. Außerdem zieht diese Faservermehrung auch allem Anschein nach eine Kapillarvermehrung nach sich.

Die exzentrische Hypertrophie, die man als ungünstig ansehen muß, führt nach Überschreiten einer Grenzschichtdicke der Fasern zu einer Stoffwechselinsuffizienz, zumal die Herzmuskelkerne sich in Mittellage befinden und daher besonders leicht O_2 Mangel eintritt und Stoffwechselschlacken schlechter abtransportiert werden können.

Nekrosen von Herzmuskelfasern infolge mangelhafter O_2 Versorgung und starke Hypertrophie führen zu einer irreversiblen Dilatation, der sog. Gefügedilatation. Hier sehen wir in diesem Fall eine Dilatation bei erheblich verdickten Muskelfasern. Bei der exzentrischen Hypertrophie kann man weiter folgende pathologische Veränderung feststellen: die Gestalt der Herzmuskelfaser ist im Querschnitt nicht mehr drehrund sondern gelappt. Die Herzmuskelfasern zeigen vakuolige degenerative Prozesse. Weiter beobachtet man: basophile Degeneration, Verfettung, Pigmentierung, Myofibrosis und Kernveränderungen.

Nach Linzbach spielen sich bei Entstehung der Hypertrophie folgende Vorgänge ab. Zunächst tritt eine Vermehrung des Sarkoplasmas ein. Sie soll ihre Ursache in einem vermehrten Eintritt von Salzen, Wasser, Aminosäuren und anderen Stoffen haben. Eine weitere erhöhte Permeabilität der Fasermembran läßt dann auch größere Moleküle, z. B. Albumine, eintreten. Aus diesen amorphen Eiweißstoffen des Sarkoplasmas sollen sich dann Linearproteine, die Myosinmoleküle, die Bausteine der Fibrillen bilden. Nun stehen Myofibrillen und Sarkoplasma nach dem Massenwirkungsgesetz in einem bestimmten Gleichgewicht. Auf Grund der Sarkoplasmavermehrung und der länger anhaltenden tonogenen Dilatation kommt es zu einem chemischen Um- und Anbau der ungeordneten Moleküle des Sarkoplasmas und zur Bildung von Myosinfäden. Es stellt sich also auf einer höheren Ebene wieder ein optimales Gleichgewicht zwischen Myofibrillen und Sarkoplasma ein. Linzbach vermutet in höheren Gewichtsbereichen des Herzens eher eine Verstärkung der schon vorhandenen Myofibrillen als eine Neubildung.

Jeder zunächst durchaus physiologischen Hypertrophie sind Grenzen gesetzt. Jenseits dieser Grenzen haben wir keine optimalen Leistungen, sondern Disharmonien des Stoffwechsels zu erwarten. Ist nun durch dauernde Anlagerung neuer Substanz an die alte die optimale Faserdicke gleich der Grenzschichtdicke überschritten, so ist ein weiterer Anbau von Myosinfäden nicht mehr möglich. Die Sarkoplasmavermehrung als solche schreitet weiter fort, so daß sich bald ein erhebliches Mißverhältnis von Myofibrillen zu Sarkoplasma einstellt. Als Folge treten dann degenerative Veränderungen, die oben beschrieben wurden, auf.

Die funktionell optimale Dicke der Faser ist beim kritischen Herzgewicht (beim Menschen 500 g) erreicht; jenseits dieser Grenze zeigt sich eine sog. strukturelle Insuffizienz, d. h. die Linearproteine sind nicht mehr achsenparallel den Myosinfibrillen angelagert. Bei der Kontraktion kommt es dann zur Sprengung der Mizellen durch Lösen von Nebenvalenzen.

Auf Grund dieser morphologischen Veränderungen, die in den verschiedenen Phasen der Hypertrophie beobachtet werden können, erscheint es möglich, daß Veränderungen insbesondere der Strukturproteine sich mit chemischen Methoden erfassen lassen.

Muskeleiweiß

Das Muskelgewebe besteht zu ungefähr 80 % aus Wasser. Die Trockensubstanz der frischen Muskulatur besteht zu 16 - 18 % aus Eiweiß, den Rest machen anorganische Bestandteile aus. Mit geeigneten Extraktionslösungen und entsprechender Behandlung des Muskels lassen sich die meisten Proteine darstellen. Man trennt zwischen Albuminen, Globulinen und Stromaproteinen. Die Anzahl der Proteine, die man erhält, hängt wesentlich von der Ionenstärke der Extraktionslösungen und von dem Charakter der Ionen, die sie enthalten, ab.

Auf präparativem Wege lassen sich die folgenden Proteinfractionen darstellen:

Myoalbumin. Es wurde zuerst von Bate-Smith beschrieben; bisher hat man diese Eiweißfraktion des Muskels nur in denaturierter Form isolieren können. Das Myoalbumin hat seinen I.P. bei pH 3 - 3,5 und bildet hier einen Niederschlag. Zum Unterschied zu anderen Proteinfractionen ist es vor wie auch nach Säurebehandlung sowohl in Wasser als auch in Salzlösungen löslich.

Man brachte dem Myoalbumin lange Zeit relativ geringes Interesse entgegen. Die ganze Aufmerksamkeit galt einer anderen Muskelproteingruppe, dem Myosinkomplex.

Myosin

Der Name Myosin wurde für das Protein der Muskelkontraktion von v. Fürth geprägt. Schramm und Weber fanden zwei in der Ultrazentrifuge verschieden schnell sedimentierende Myosine, die sie S-Myosin und L-Myosin nannten. F. B. Straub brachte, indem er das Stromaprotein Actin darstellte, eine Klärung in diese Lage. Er konnte beweisen, daß das S-Myosin, welches er treffender als Actomyosin bezeichnete, aus dem Stromaprotein Actin und dem L-Myosin zusammengesetzt ist. H. Portzehl hat das Molekulargewicht von L-Myosin mit der Ultrazentrifuge bestimmt (880 000). Danach ist das L-Myosin ein Partikel einer Mizelle mit der Länge von 2200 - 2400 Å und einem Durchmesser von 22 - 23 Å. Die Flockung des L-Myosins wird bei pH 7 mit steigender Ionenstärke bis $\mu 0,03$ (0,03 molare HCl) dichter und kompakter. Oberhalb $\mu 0,03$ ist die Einsalzgrenze überschritten. Das L-Myosin geht mehr und mehr in den echten Lösungszustand über und ist bei etwa $\mu 0,3$ vollständig gelöst. L-Myosin-Extrakte sind weitgehend, bisweilen völlig frei von Actin bzw. von Actomyosin, wenn ein saures pH (6,0 - 6,5) und eine kurze Extraktionszeit gewählt wird. (Portzehl und Jaisle) Nach besonders schonender Fällung des Gesamtmyosins bei $\mu 0,04$ folgt eine fraktionierte Lösung des Niederschlages bei $\mu 0,3$. Dann bleibt das Actomyosin unlöslich und L-Myosin geht in Lösung. Szent-Györgyi stellte fest, daß die Löslichkeit des Actomyosins bis $\mu 0,03$ abnimmt, wenig Änderung bis $\mu 0,3$ zeigt, dann jedoch rasch ansteigt und von $\mu 0,35$ bis zur Aussalzgrenze konstant bleibt.

Das Actin kommt in zwei Formen vor, dem G-Actin und F-Actin. Das G-Actin ist zusammengesetzt aus globären Elementen. Das F-Actin besteht elektronenoptisch aus feinen Fibrillen, aufgebaut aus der linearen Aggregation der globären Einheiten des G-Actins während der Polymerisation. Für diese Polymerisation werden Mg-Ionen und SH-Gruppen des Actins benötigt. Andererseits sind die SH-Gruppen des L-Myosins notwendig für die Bildung des Actomyosinkomplexes aus F-Actin und L-Myosin. Mit welchen Gruppen des F-Actins die SH-Gruppen des L-Myosins reagieren, ist trotz intensiver Untersuchungen u. a. von Kuschinski und Turba 1951 nicht klar ersichtlich.

Alle fibrillären Proteine des Muskels bilden makroskopisch amorphe Gele.

Elektronenoptisch zeigen sie eine Ordnung und zwar sind diese Molekülverbände Seite an Seite und Ende an Ende gelagert. H. H. Weber beobachtete, daß sich aus konzentrierten Myosinlösungen (präpariert nach Weber-Edsall), die sowohl L-Myosin als auch Actomyosin enthalten, durch kapillare Öffnung in aqua dest. Bad getrieben, Fäden spinnen lassen. Diese Fadenmodelle haben bei näherer Untersuchung interessante Ergebnisse geliefert. Es zeigte sich eine große Ähnlichkeit mit den anisotropischen Teilen der quergestreiften Muskelfibrillen; außerdem war das Röntgenspektrum dem des Muskels ähnlich. Beide zeigten einen Keratin-Typ. Die Analyse dieser Modelle hat gezeigt, daß die Kontraktion, die Schrumpfung und die Superpräzipitation des F-Actomyosins anscheinend auf dem gleichen Fundamentalprozeß beruhen wie die Kontraktion des lebenden Muskels. Ist dies der Fall, so müßte man folgende Eigenschaften von L-Myosin und F-Actin im Muskel wiederfinden: Röntgendiagramm, fadenförmige Teilchengestalt und Doppelbrechung. In der Tat fand man an den Modellen das wohl orientierte Diagramm des L-Myosins, welches dem Weitwinkeldiagramm des Muskels entspricht. Die Mehrzahl der Kleinwinkelperioden entsprechen nach S. Astbury dem F-Actin. Folglich ist mit Recht behauptet worden, daß sowohl im Fadenmodell als auch im Muskel eine wohl geordnete fibrilläre, parallel zur Längsachse gelagerte, Fadenpartikelchen-Anordnung zu finden ist. Mit Sicherheit allerdings kann man nur achsenparallele Fadenpartikelchen in den anisotropen Banden des Muskels nachweisen, denn diese zeigen die für die Fadenpartikelchen charakteristische positive Eigen- und Stäbchendoppelbrechung.

Es galt für eine lange Zeit als gesichert, daß das Actomyosin einzig und allein in den A-Banden untergebracht sei, doch in den letzten 10 Jahren zeigten sich Bedenken gegen diese Annahme. Gerendas und Matoltsy 1948 behaupteten, daß durch Harnstoff aus dem Muskel ein Protein (N-Protein) extrahiert werden könne mit negativer Strömungsdoppelbrechung, das in den I-Banden der Muskelfibrille liegen und dort die positive Doppelbrechung kompensieren soll. Trotz heftiger Kritik (Dubuisson, Schneider und Hasselbach) ist dieser Gedanke nicht ganz abwegig, denn bei dem Versuch, den ganzen Actomyosingehalt der Muskelfaser in die A-Bande zu legen, zeigen sich auf Grund neuerer Ergebnisse erhebliche Schwierigkeiten. Bedenkt man, daß die A-Bande nur 65 % des Volumens der Muskelfibrille beim Wirbeltier ausmacht und das ganze Fibrillenvolumen höchstens 60 - 80 % des Faservolumens erreicht, so könnte man nur das Actomyosin in den A-Banden unterbringen, wenn man eine viel höhere Eiweißkonzentration in diesen Abschnitten des Muskels annimmt als in den übrigen. Man versuchte diese Annahme durch die Tatsache der dunkleren Färbung der A-Bande, die man auf eine Anhäu-

fung von Salzen, entsprechend der Anreicherung von Actomyosin zurückführte, zu untermauern.

Neuerdings wurde in elektronenoptischen Untersuchungen eindeutig nachgewiesen, daß fibrilläre Strukturen nicht allein durch die A-Bande sondern auch durch die I-Bande hindurchlaufen. Die Frage ist allerdings, ob es sich um F-Actin oder Actomyosinfäden handelt. Auch über die Anordnung und das Gesamtvolumen der Filamente einer Fibrille gehen die Meinungen erheblich auseinander. Auf der einen Seite sehen Ashley und Baker die Fibrille als ein Rohr an, das innen dünn mit achsenparallel verlaufenden Filamenten und "A-Substance" ausgekleidet ist. Das Innere ist wässrig. Szent-Györgyi und andere Autoren hingegen sehen den ganzen Fibrillenabschnitt mit Filamenten ausgefüllt.

Im vorhergehenden Abschnitt ist versucht worden, die Lage des Actomyosins im Muskelgefüge zu verifizieren. Von selbst drängt sich die Frage auf, wieviel das L-Myosin, F-Actin $\rightarrow$ F-Actomyosin prozentual gesehen von der Gesamtmenge des Muskeleiweißkörpers ausmacht. Die Schwierigkeit der Beantwortung dieser Frage lag in dem Unvermögen, Myosin und Actin exact voneinander getrennt zu extrahieren. Meistens ergab die Extraktion eine unkontrollierbare Mischung von L-Myosin, F-Actin, G-Actin und F-Actomyosin. Erst Hasselbach und Schneider fanden 1952 eine geeignete Methode zur Einzeldarstellung dieser Proteine. Sie fanden 38 % L-Myosin und 13 - 15 % Actin. Auf 1 Mol. Actin kommen also 2,5 - 3 Mol-Myosin. Das F-Actomyosin macht also rund 52 % der Muskelproteine aus. Rechnet man noch das N-Protein, wenn man es als Myosin deutet, hinzu, so ergibt sich ein Prozentsatz von 56 %. Hasselbach und Schneider sehen diese 3 - 5 % an Proteinsubstanz, die nur durch 30 %ige Harnstofflösung noch extrahiert werden kann, nach einer erschöpfenden Extraktion mit einer Weber-Edsall-Lösung, als den Rest an zurückgebliebenem L-Myosin und F-Actin an.

Die nun folgende Tabelle zeigt besonders deutlich die Schwierigkeit, den prozentualen Anteil des Muskels (Trockensubstanz) an L-Myosin und Actin anzugeben.

Kaninchen	L-Myosin	Actin	Stroma
Weber und Meyer 1933	39 %	0	17 %
Bate-Smith 1937		57 %	16 %
Hasselbach und Schneider 1951	38 %	14 %	20 % und 16 % nach Harnstoffextraktion

Der Wert von Weber sollte ursprünglich den Actomyosingehalt darstellen, doch ist es offensichtlich nicht, zumal bei einem alkalischen pH 8 - 9 extrahiert wurde. In diesem Milieu ist das F-Actin bei Abwesenheit von ATP irreversibel depolymerisiert zu G-Actin; Actomyosin kann sich also unmöglich bilden. Die 57 %, die Bate-Smith angeben, sind als Actomyosin anzusehen.

Der Vollständigkeit halber soll noch das Tropomyosin, Nucleotropomyosin und das Paramyosin erwähnt werden, Hamoir, Snellmann und Tenow haben über diese Proteine Versuche an der Uterusmuskulatur der Kuh gemacht. Bei der Darstellung des Myosins zeigte sich weniger als 5 % Myosin, Actin und 60 % Tropomyosin. Bei dem Versuch, das Actomyosin aus der Uterusmuskulatur zu präparieren, zeigte sich ein kontraktiles Proteinkomplex, der zwar sehr dem Actomyosin ähnelte, doch sich in mancher Hinsicht vom Actomyosin unterschied. Snellmann wählte den Namen Actotropomyosin für diese Substanz. Die Ultrazentrifugen-Sedimentation des Actotropomyosins ist gleich der des Actomyosins. Im Elektrophoresediagramm zeigte sich eine größere Wanderungsgeschwindigkeit des Actotropomyosins. Ebenso wie das Actomyosin bildete auch das Actotropomyosin Fäden. Nach Snellmann enthält das Actotropomyosin: Actin, phosphatabsorbierendes Protein und Nukleotropomyosin.

Die beiden letztgenannten Stoffe bilden einen Komplex, der wie das Myosin wirkt; das phosphatadsorbierende Protein ist dann wahrscheinlich Träger der enzymatischen Eigenschaften. Auf Grund der nahen Verwandtschaft und der großen Ähnlichkeit zwischen L-Myosin und Tropomyosin sehen einige Autoren im letzteren einen Baustein des L-Myosins.

Ein weniger bekanntes Protein ist das Globulin X, es zeigt nicht die Eigenschaften der kontraktilen Proteine wie Doppelbrechung und bildet keine spinnbaren Fäden. Dieses Protein fällt aus bei einer Salzkonzentration von 0,005 molare KCl, während Myogen in Lösung bleibt; der I.P. liegt bei pH 5,0. Man neigt dazu, das Globulin X als eine Mischung von mehreren Muskelproteinen anzusehen.

Myogen

Es ist ein wasserlösliches Protein mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 80 000 - 100 000, es zeigt keine Doppelbrechung, eine ganz geringe Viskosität und eine starke enzymatische Aktivität. Schon hieraus ist ersichtlich, daß das Myogen nicht unmittelbar am Kontraktionsvorgang beteiligt ist,

sondern ein Eiweißstoff des Sarkoplasmas ist. Baranowski beschrieb zwei Myogen-Fractionen, das Myogen A und das Myogen B, die er nach Ammoniumsulfat-Fällung erhielt. Nach Baranowski und Niederland ist das Myogen A einheitlich und stellt die Aldolase dar. Außerdem enthält das Myogen mit Sicherheit die Fermente Glycerinaldehyddehydrogenase, Phosphoglucomutase und noch mehrere andere.

Neben dem Versuch auf präparativem Wege Einzelheiten über den Aufbau der Muskelproteine zu erhalten, wurde besonders in jüngerer Zeit versucht, mit Hilfe der Elektrophorese etwas über die Muskelproteine auszusagen.

Untersucht man einen Salzextrakt z. B. einer Ionenstärke von 0,35 bei neutralem pH, so kann man bei anodischer Wanderung am aufsteigenden Ast eine Reihe von Fraktionen unterscheiden, die zum Teil identifiziert werden konnten:

Myoalbumin. Es ist das am schnellsten wandernde Protein, und wandert, wenn man die Gruppeneinteilung der Fraktionen von Jacob benutzt, in dessen Gruppe III. Gerade in jüngerer Zeit ist dem Myoalbumin größere Beachtung geschenkt worden (P. Crepax, Cruck), zumal anscheinend eine Relation zwischen dem Myoalbumin und der Myogengruppe besteht. Untersucht man nacheinander Extrakte von Skelettmuskeln, Ventrikeln, Vorhöfen und Reizleitungsgewebe, so zeigt sich eine deutliche Zunahme des Myoalbumins, während das Myogen in gleichem Maße vom Skelettmuskel bis zum Reizleitungsgewebe hin abnimmt. Diesen Unterschied zwischen Ventrikel und Vorhof können wir in unserer Arbeit bestätigen. Ferner zeigte sich nach Denervierung eines Skelettmuskels auch eine Anreicherung von Myoalbumin bei der Untersuchung solcher Muskelextrakte. Die Tatsache, daß der embryonale Muskel prozentual gesehen, erheblich mehr Myoalbumin enthält als der fertige Skelettmuskel gab Anlaß zu der Hypothese, daß das Myoalbumin ein Reserveprotein darstellt, das, wenn es die Umstände erfordern, ein anderes, höher differenziertes und spezialisiertes Protein aufbauen kann. So könnte man auch verstehen, daß das Reizleitungssystem, welches zwar eine ganz spezifische Funktion, jedoch histologisch einen relativ primitiven Charakter besitzt, so reich an Myoalbumin ist. Die Ventrikelmuskulatur hingegen stellt, was die Kontraktilität anbelangt, ein stärker spezialisiertes Gewebe dar und enthält weniger Myoalbumin als das Reizleitungssystem. Mit Hilfe der gleichen Überlegung läßt sich das Vorhofmyokard zwischen Ventrikel- und Reizleitungsgewebe einordnen.

In der von uns gewählten Versuchsanordnung stellt sich das Myoalbumin nicht als einheitliche Fraktion dar. Mit Regelmäßigkeit konnten wir in der Gruppe III neben einer besonders deutlich ausgeprägten Fraktion noch eine Anzahl weniger charakteristischer Proteinfractionen beobachten. Unterwirft man einen Salzextrakt von niedriger Ionenstärke z. B. $\mu 0,15$ einer elektrophoretischen Untersuchung, so zeigt sich eine besonders gute Auftrennung der einzelnen Myoalbuminfractionen.

Myosin. Die nach dem Myoalbumin erscheinende Fraktion des Myosinkomplexes im Pherogramm ist in besonderem Maße abhängig von den Versuchsbedingungen. In einem besonderen Abschnitt soll auf dieses Abhängigkeitsverhältnis noch näher eingegangen werden. Nimmt man z. B. Muskel-extrakte, die nach einer 2-stündigen Extraktion mit einer Salzlösung von $\mu 0,5$ z. B. Weber-Lösung gewonnen und anschließend gegen einen Puffer ähnlich hoher Ionenstärke dialysiert und dann mit dem gleichen Puffer elektrophoretisch ausgewertet wurden, so zeigen sich 2 charakteristische Gradienten, von denen der schneller wandernde identisch ist mit dem Actomyosin und der darauffolgende mit dem L-Myosin.

Ein weiteres Protein, das auch zum Myosinkomplex gezählt wird, ist das Myosin μ , auch Kontraktin genannt; es wurde zuerst von Dubuissou beschrieben. Bisher war es nur möglich, dieses Myosin in Kaninchenskelettmuskeln zu beobachten. Unser Wissen um dieses Protein ist immer noch recht spärlich. Es scheint in einem unmittelbaren Abhängigkeitsverhältnis zum Funktionszustand des Muskels zu stehen. In Extrakten ($\mu 0,35$) von normalen ruhenden Muskeln ist das Kontraktin nicht immer und wenn, dann nur in geringen Konzentrationen nachzuweisen. Untersucht man aber in diesem für das Actomyosin kritischen Bereich der Ionenstärke einen Skelettmuskel des Kaninchens in Halogen-Acetatstarre, rigor mortis oder Fixation im Tetanus durch flüssige Luft, so tritt das Kontraktin in größerer Menge auf. Von großer Bedeutung ist, daß parallel zum Erscheinen des Kontraktins im Elektrophorese-Diagramm ein Verschwinden der $\alpha + \beta$ -Bande (die dem Actomyosin und dem L-Myosin entsprechen) eintritt.

Vielleicht beruht diese Tatsache auf der Dissoziationsunfähigkeit des Actomyosins nach Erschöpfung des Muskel-ATP. Dubuissou hält diese Erklärung für ungenügend, wenn nicht sogar unwahrscheinlich. Als weitere Möglichkeit wird die Denaturierung des Actomyosins in der Zeit des ATP-Mangels diskutiert. Noch schwieriger ist es, eine stichhaltige Erklärung für das Auftreten des Kontraktins zu finden. Vielleicht handelt es sich um eine Umladung der

anderen Myosinkomponenten. Möglich wäre allerdings auch eine Freisetzung einer präformierten Komponenten, die im ruhenden Muskel durch Bindungskräfte so fest gebunden ist, daß sie nicht extrahiert werden kann. α - und β -Myosin sind in Starre evtl. stärker gebunden, während das Myosin γ ein umgekehrtes Verhalten zeigt. Ferner wird auch eine Neubildung aus anderen Proteinen diskutiert.

Myogen. Die elektrophoretisch geringste Wanderungsgeschwindigkeit zeigt das Myogen. Es kommt in Jacobs Gruppe I zur Darstellung. Nach Disteche zeigten sich allerdings nach längerer Laufzeit der Elektrophorese bei niedrigerer Ionenstärke zwei Gradienten. Jacob wählte hierfür die Symbole 1 und 1₁; ob es sich hierbei um zwei verschiedene Aldolasen handelt, ist ² noch nicht klar ersichtlich.

Sehr leicht kann es gerade in der Myogen-Gruppe zu fehlerhaften Analysen kommen, da das Hämoglobin, wenn es nicht sehr exakt aus dem Muskel entfernt wird, wegen seiner ähnlichen Wandergeschwindigkeit die Myogenfraktion im Pherogramm erheblich verfälschen kann, wie noch später gezeigt wird.

Vergleicht man die Ergebnisse, die man auf präparativem und elektrophoretischem Weg gewinnt, miteinander, so zeigt sich, daß sie nicht ohne weiteres übereinstimmen.

Auf präparativem Weg ließ sich z. B. aus Muskelextrakten das Globulin X isolieren, das im elektrophoretischen Bild nie beschrieben worden ist. Globulin X wurde zusammen mit dem Myogen von H. H. Weber aus dem Sarkoplasma isoliert. Das von Bate-Smith zuerst beschriebene Myoalbumin wurde andererseits von Weber nie erwähnt.

Das Myogen und das Globulin X ergeben nach Weber 50 % des gesamtlöslichen Eiweißes; die restlichen 50 % macht der Myosinkomplex aus. Die Dubuisson-Schule und auch wir, fanden auf elektrophoretischem Weg, daß das Dubuisson-Myogen und Myoalbumin rund 50 % der Gesamteiweißkonzentration ausmacht; die restlichen 50 % bildete der Myosinkomplex.

Auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse ist anzunehmen, daß das Myoalbumin einen Teil des Weber-Myogens darstellt. Das restliche Weber-Myogen und das Globulin X müßte man dann in der Dubuisson-Myogen-Fraktion suchen.

Faktoren, die das Ergebnis der Elektrophorese beeinflussen

Schon länger ist durch Szent-Györgyi bekannt, daß der Gehalt an Actomyosin, der in einem nach Weber-Edsall präparierten Myosin enthalten ist, in unmittelbarer Abhängigkeit zur Extraktionszeit steht. Szent-Györgyi unterscheidet zwischen einem "short time extraction myosin" (20 Min.), das wenig Actomyosin und einen größeren Anteil seines "myosin proper", das dem L-Myosin entspricht, enthält, für das er den Begriff Myosin A geprägt hat, und einem "long time extraction myosin" (einige Std.), Myosin B genannt, das reichlich Actomyosin und weniger "myosin proper" enthält. Bei der Verlängerung der Extraktion wird mehr und mehr α Myosin auf Kosten von β Myosin gebildet.

Zum anderen ist die Dichte der umhüllenden, unlöslichen Muskelstruktur von Einfluß auf die Extraktionsgeschwindigkeit. Es ist interessant, zu wissen, daß diese Muskelstruktur eine Auflockerung durch alkalische Reaktion erfährt. Diese umhüllende, unlösliche Muskelstruktur wird man zweckdienlich vor einer Extraktion weitgehend mechanisch zerstören; sei es mittels einer Embryonenquetsche, durch zerschneiden mit einem "Waringblendor", durch Schneiden in dünne Scheiben mit einem Gefriermikrotom oder durch Pulverisieren des tiefgekühlten Muskels im Mörser, wie wir es in unseren Versuchen gemacht haben. Speziell die fibrillären Eiweißkörper gehen erst nach einer gründlichen mechanischen Zerkleinerung in Lösung. Schneidet man einen Muskel in kleine Stücke, so läßt sich u. a. das L-Myosin gut extrahieren, nicht dagegen das Actin. Erst nach einer intensiven Zerkleinerung z. B. im "Blendor" geht das Actin in die Extraktionslösung über. Diese Tatsache haben sich Hasselbach und Schneider bei ihren Untersuchungen 1951 zu Nutze gemacht. Je länger die "Blendor"-Behandlung andauert, um so mehr F-Actin erhält man. Wird das L-Myosin auch erst nach einer "Blendor"-Behandlung extrahiert, so bildet sich, da L-Myosin und F-Actin gleichzeitig austreten, sofort Actomyosin.

Von grundlegender Bedeutung ist ferner die Ionenstärke der Extraktionslösung; am gebräuchlichsten sind die Ionenstärken von $\mu 0,15$, $\mu 0,35$ und $\mu 0,50$. Dubuisson hat gefunden, daß die Proteine des Myosinkomplexes nur dann aus dem Muskel extrahiert werden können, wenn die Lösung eine höhere Konzentration besitzt, als die, die nötig ist, diese Proteine in Lösung zu halten. Das L-Myosin ist erst bei einer $\mu 0,3$ völlig gelöst. Nach Szent-Györgyi erreicht die Löslichkeit des Actomyosins oberhalb einer Ionenstärke von $\mu 0,35$ ihr Maximum. Daraus läßt sich ohne weiteres ableiten, daß im Pherogramm

eines Extraktes mit der Ionenstärke $\mu 0,15$ der Myosinkomplex nur andeungsweise vorhanden ist. Elektrophoresen, die bei dieser Ionenstärke vorgenommen werden, zeigen, wie Jacob gezeigt hat, eine wesentlich bessere Aufteilung der erhaltenen Proteinfractionen. Erst bei Extraktion mit einer Lösung von $\mu 0,35$ stellt sich im elektrophoretischen Bild auch die Myosin-
gruppe des Skelettmuskels dar.

Während man normalerweise die Myosine des Skelettmuskels mit Hilfe von Lösungen einer Ionenstärke von $\mu 0,35$ extrahieren kann, lassen sich die Myosine des Herzmuskels nach Cruck erst mit Extraktionslösungen von der Ionenstärke $\mu 0,5$ zur Darstellung bringen, eine Angabe, die nach den Ergebnissen von Nowy und Mitarbeiter nicht zutrifft.

Versuche von Crepax weisen darauf hin, daß ATP eine Wirkung auf die Extrahierbarkeit der Eiweißstoffe hat und zwar in einer Verstärkung der dissoziierenden Wirkung der Elektrolyte auf die Bindungskräfte, die die Proteine im Muskel festhalten.

Neben der Ionenstärke der Salzlösung ist auch die Art der Ionen für die Extraktion wichtig. Die gebräuchlichsten Extraktionslösungen sind Salzlösungen, die eine ganz bestimmte "brechende Kraft" (breaking force), die von der Natur der Ionen abhängt, auf die bindenden Kräfte haben. Nun ist es auch möglich, solche Proteine zu extrahieren, deren Bindungskräfte sich bei der Verkürzung verstärkt haben, und zwar mit Extraktionslösungen, deren Ionen eine stärkere "brechende Kraft" haben, so z.B. Pyrophosphat und KJ. Extrahiert man einen Muskel, der in Starre geraten ist, in der herkömmlichen Weise nach Weber-Edsall (KCl), so zeigt sich im Elektrophoresediagramm keine deutlich abgrenzbare Myosin-Zacke, hingegen aber eine deutlich abgrenzbare Kontraktinfraktion. Benutzt man jedoch KJ als Extraktionslösung, so ergibt sich ein Pherogramm, das sich nicht von dem eines Muskels, der in erschlafftem Zustand extrahiert wurde, unterscheidet; d.h. Gegenwart von reichlich Myosin β und Abwesenheit oder nur eine sehr geringe Menge von Kontraktin. Vergleicht man verschiedene Extraktionslösungen miteinander, so ergibt sich, daß KJ mit 6,85 % die höchste Eiweißausbeute liefert. Sie beträgt bei Kaliumpyrophosphat 6,4 %, bei KCl 6,0 %, bei CaCl_2 4,55 % und Kaliumacetat nur 3,55 %.

Abhängigkeit der Löslichkeit der Muskeleiweißfraktionen von der Ionenkonzentration

Fraktion	0,03	0,15	0,30	0,35	0,50
Myoalbumin	+	+	+	+	+
Aktomyosin	-	-	(+)	+	+
Myogen	+	+	+	+	+

+) Protein in Lösung

Eigene Versuche

Methodik

I. Operation

a) Vorbereitung

Junge, 3 Monate alte männliche Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von rund 3 kg werden mit 10 ccm einer 20 %igen Urethan-Lösung i. v. gespritzt und mit Äther, wenn nötig, tiefer narkotisiert. Das Tier wird in gestreckter Rückenlage am Kopf und an den vier Extremitäten fixiert. Am Hals des Kaninchens wird ein ungefähr 8 - 10 qcm großes Feld geschoren und mit Sepso-Tinktur bestrichen. Vor Beginn der Operation wird ein EKG (Extremitätenableitung) gemacht.

b) Operationstechnik

Operation und Druckmessungen ausgeführt von H. Nowy und Frings

Ein ca. 5 cm langer medianer Haut- und Faszienschnitt wird am Hals angelegt und die rechte A. carotis wird stumpf freigelegt. Um das Gefäß werden zwei Schlingen im Abstand von ca. 2,5 cm gelegt. Die A. Carotis wird nun aortennah abgeklemmt, an der distalen abgebunden und zwischen den beiden angelegten Schlingen mit einem Skalpell geöffnet. In diese Öffnung wird ein 15 cm langes, 2 mm starkes kanülenartiges Instrument, dessen Spitze zackenförmig angefräst ist, bis in die Aorta eingeführt. Dieses Instrument wird von einem stumpfen Mandrin verschlossen, der die Kanülenspitze um 1,5 mm überragt, um einer Gefäßwandverletzung vorzubeugen. Gleichzeitig mit dem Einführen des Instrumentes wird die angelegte Klemme entfernt und die proximale Schlinge um die Kanüle leicht angezogen. Der Mandrin wird entfernt und zunächst der Blutdruck in der A. carotis mittels eines geeichten elektrischen Druckelementes gemessen. Nach beendeter Druckmessung wird der Mandrin wieder eingeführt. Nun wird das Instrument herzwärts vorgeschoben, bis man auf einen Widerstand stößt, den die Aortenklappen bilden. Nach scharfer Durchtrennung der Klappe unter fortlaufender Druckmessung befindet sich die Spitze des Instrumentes im linken Ventrikel. Sobald die Druckmessung bei Zurückziehen der Kanülenspitze in die Aorta einen ausreichenden diastolischen Druckabfall zeigt, wird das Instrument herausgezogen und die A. carotis mit der angelegten proximalen Schlinge verschlossen. Daraufhin erfolgt Wundverschluß. Die Tiere erhalten an den 3 auf die Operation folgenden Tagen Gaben von je 200 000 I.E. Penicillin.

II. Sektion

Das Kaninchen wird mit 10 ccm einer 20 %igen Urethan-Lösung i. v. narkotisiert. Auf die Basisnarkose folgt, wenn nötig, eine zusätzliche Äthernarkose. Das Tier wird in gestreckter Rückenlage am Kopf und an den 4 Extremitäten auf einem Kaninchenbrett fixiert. Am Hals des Kaninchens wird ein ca. 8 - 10 cm großes Feld geschoren, anschließend wird ein EKG (Extremitätenableitung) gemacht. Dann wird die linke A. carotis stumpf freigelegt. Anschließend erfolgt die Druckregistrierung in der linken A. carotis mit einer Kanüle Nr. 1. Daraufhin wird der Thorax median gespalten, das Herz von den großen Gefäßen abgetrennt und in einer Porzellanschale, die Tyrodelösung (plus Glucosezusatz) von ca. 30° C enthält, grob abgewaschen. Anschließend wird das Herz in eine zweite Schale mit Tyrodelösung von der gleichen Temperatur gelegt. Unter dem Flüssigkeitsspiegel wird eine Kanüle mit Tyrodezuleitung in die Aorta des schlagenden Herzens eingeführt und eingebunden. Unter Druck werden nun die Coronargefäße von der Aorta her durchspült, bis die Flüssigkeit klar bleibt. Am schlagenden Herzen werden Gefäß- und Pericardreste entfernt. Dann wird das restliche Aortenstück mit eingebundener Kanüle vom Herzen abgetrennt. Nun wird das gereinigte schlagende Herz auf einem mit Filterpapier abgedeckten Behälter mit Seesand gelegt und mit in flüssigem Stickstoff tiefgeköhlten Stahlnadeln durchbohrt und an diese angefroren. Diese Stahlnadeln besitzen einen Durchmesser von 0,5 mm und stehen im Abstand von 1 mm in Reihe auf einer Grundplatte, die mit einem hölzernen Handgriff verbunden ist. Danach wird das ganze Herz in flüssigen Stickstoff getaucht und vollständig durchgefroren. Nachdem das Herz von den Stahlnadeln gelöst ist, wird es auf einer Porzellanschale in einen Behälter mit Trockeneis bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

III. Tierdaten

Wir führten Versuche an 19 Kaninchen durch, von denen 8 operiert wurden. Als Folge des Aortenklappenvitiums entwickelte sich eine Herzhypertrophie. Rund 6 Monate nach der Operation wurde das Herz untersucht.

Die restlichen 11 Tiere waren "Normaltiere"; sie waren weder operiert, noch mit Medikamenten behandelt worden. Aus der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Tierdaten zu ersehen.

Tier Nr.	Tierge- wicht kg	Herzge- wicht g	Ventrikel- gewicht g	<u>Herzgewicht (g)</u> <u>Tiergewicht (kg)</u>
N I	-	9,2	7,6	-
N II	3,87	11,25	9,2	2,9
N III	3,72	9,8	7,6	2,64
N IV	3,91	9,6	7,9	2,45
N V	4,1	9,0	7,55	2,2
N VI	-	8,15	6,65	-
N VII	2,8	7,45	6,5	3,0
N VIII	2,6	8,7	7,5	3,35
N 123	3,55	7,83	6,89	2,2
N 125	3,09	7,45	6,42	2,41
S 332	3,3	8,81	6,9	2,67
op. 205	3,25	13,65	11,45	4,2
op. 210	3,9	11,6	9,0	2,98
op. 217	2,92	10,15	7,4	3,5
op. 220	3,2	13,4	11,0	4,0
op. 221	3,65	15,1	12,5	4,12
op. 222	3,4	15,0	12,7	4,4
op. 224	3,7	11,7	9,9	3,15
op. 234	3,75	14,2	11,7	3,8

Die Größe des erzeugten Klappendefektes kann nach der Zunahme der Druckamplitude beurteilt werden. Im Durchschnitt beträgt die Amplitude bei Normaltieren 23 mmHg und bei den operierten Tieren 52 mmHg. Diese Normalwerte wurden anhand eines großen Tiermaterials ermittelt (Nowy H. und H.D. Frings). Bei 6 der von uns operierten Tiere wurde eine Druckmessung vorgenommen.

Die folgende Tabelle zeigt die in der A. carotis gemessenen Druckwerte.

Tier Nr.	vor Op. mmHg	Ampl. mmHg	nach Op. mmHg	Ampl. mmHg	vor Sekt. mmHg	Ampl. mmHg
217	P 120/91	29	-		N 127/72	55
220	P 109/90	22	P 100/48	52	N 116/72	44
221	P 121/98	23	P 120/55	65	N 119/67	64
222	P 116/92	24	P 116/68	48	N 134/78	56
224	P 130/103	27	P 124/69	55	N 123/73	50
234	P 119/99	20	P 116/73	43	fehlt	

P = Perforator

N = Kanüle V 2A Nr. 1

IV. Gewinnung des Herzmuskelextraktes

Das auf Trockeneis gelagerte Herz wird langsam auf eine Temperatur nahe dem Gefrierpunkt gebracht. Nachdem die Reste der Aorta, der Vv. cavae caudalis et cranialis und der Pulmonalgefäße entfernt worden sind, wird das Herz gewogen. Dann werden Vorhöfe und Kammern voneinander getrennt und die Gewichte bestimmt. Anschließend erfolgt die Präparation in li. Ventrikel, Septum, re. Ventrikel, Außenwand und Vorhöfe. Ein Papillarmuskel des li. Ventrikels wird herausgelöst und für histologische Untersuchungen in Formalin fixiert. Auf einer mit Trockeneis gekühlten Glasplatte werden 1,5 - 2 g Muskelgewebe des li. Ventrikels (Spitze) bzw. der ganze re. Ventrikel bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt fein zerschnitten. In gleicher Weise wird mit den Vorhöfen verfahren. Da die Vorhöfe des Herzens bei Normaltieren nicht genügend Material für eine Elektrophorese liefern, werden jeweils die Vorhöfe von 2 oder 3 Tieren gemeinsam untersucht.

Die Glasplatte, alle Instrumente wie Skalpell und Pinzette, sowie der Porzellanmörser, in dem das fein zerschnittene Muskelgewebe anschließend pulverisiert wird, werden mit Trockeneis gekühlt, um das Substrat so kalt wie nur möglich zu halten.

Der pulverisierte Herzmuskel wird in Polyäthylenbechern, deren Gewicht bekannt ist, gewogen und aufgetaut. Die gleiche Gewichtsmenge Extraktionslösung (Weber) wird hinzugefügt und das Gefäß in den Kühlschrank gestellt. Um eine innige Vermengung von Substanz und Extraktionsflüssigkeit zu erlangen, werden bei der einstündigen Extraktion Muskelbrei und Extraktionslösung häufig mit einem Glasstab umgerührt. Nach beendeter Extraktion wird das Extraktionsprodukt in der Kältezentrifuge bei $+1^{\circ}\text{C}$ 15 Min. zentrifugiert (17 000 g).

Der klare rötlichgelb getönte Überstand wird dekantiert. Anschließend werden die Extrakte im Eisschrank 14 h gegen einen Puffer von der Ionenstärke μ 0,35 und einem pH von 7,4 dialysiert. Die Dialysierflüssigkeit wird während der 14-stündigen Dialyse mehrmals gewechselt. Es werden Dialysiergefäße nach Antweiler verwendet. Im Anschluß an die Dialyse werden die Extrakte aus den Dialysiergefäßen herauspipettiert, mit Zuckerpipetten gemessen und im Verhältnis von

1 Teil Extrakt
0,5 Teilen Puffer

verdünnt, um die für die Mikroelektrophorese günstigste Eiweißkonzentration zu erhalten. Diese verdünnten Extrakte werden dann nochmals in Polyäthylenbechern bei 17000 g in der Kältezentrifuge 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und in gekühlten Probegläsern im Kühlschrank zur weiteren Behandlung aufbewahrt.

Die Extrakte, gewonnen aus den 3 verschiedenen oben angegebenen Herzabschnitten lassen sich auf Grund ihrer Farbunterschiede leicht auseinanderhalten. Der Extrakt des li. Ventrikels zeigt eine kräftige rotgelbe Farbe, der re. Ventrikel eine blässere rotgelbe Farbnuance und der Extrakt, gewonnen aus den Vorhöfen, einen graugelben Farbton. Der Farbunterschied ist wohl hauptsächlich auf verschiedenen Myoglobingehalt zurückzuführen.

Zusammensetzung der Lösungen

Extraktion

<u>Weber-Lösung:</u>	KCl	0,6 mol
Ionenstärke 0,5	NaHCO ₃	0,04 mol
pH 9,33	Na ₂ CO ₃	0,01 mol

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

<u>f. Dialyse u. Elektrophorese:</u>	NaCl	0,2 mol
Ionenstärke μ 0,35	NaH ₂ PO ₄	0,006 mol
pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	0,048 mol

(Sörensen)

V. Mikroelektrophorese nach Antweiler

Im weiteren Verlauf des Arbeitsganges wird der zu untersuchende Muskel-extrakt in den U-förmigen Kanal und die Pufferlösung in den Pufferkanal einer Quarzküvette gefüllt. Für die Elektrophorese wird jeweils Puffer benutzt, gegen den der zu untersuchende Muskelextrakt dialysiert worden ist. Dann wird die Küvette mit Inhalt in den Küvettenhalter des Antweiler-Apparates gebracht. Unter Sicht in der Philpot-Svensson-Zusatzoptik wird der U-förmige Kanal, in dem sich der Muskelextrakt befindet, mit Puffer überschichtet. Bei der geforderten Ampere-Zahl von 2,5 mA wird eine Spannung von ca. 40 Volt erreicht. Nach einer Laufzeit von ca. 60 Min. stellen sich die Fronten meist optimal dar, was durch die Philpot-Svensson-Zusatzoptik beobachtet werden kann. Die Phorese wird nun abgebrochen. Die in der Optik zu sehende Kurve wird mit einer Leica bei gleichbleibender Spalteinstellung der Schlierenoptik fotografiert. Anschließend an diese Aufnahme erfolgt die interferometrische Ablesung.

VI. Auswertung

Aus den Trommelwerten, die bei der interferometrischen Ablesung ermittelt werden, läßt sich durch Viererdifferentiation die Gradientenkurve darstellen. Durch Anordnung der Trommelwerte in Viererreihen, wobei der 5. Meßwert unter den 1., der 9. unter den 5. usw. zu stehen kommt, wird die Viererdifferentiation erleichtert.

Auf diesem Wege erhält man Diagramme, die eine charakteristische 3-Teilung (I, II, III) aufweisen. Die Ventrikelextrakte zeigen 2 ausgeprägte Gipfel in der Komponente II. Durch Verlängern der äußeren Schenkel dieser mittleren Eiweißgruppe lassen sich die 3 Eiweißfraktionen begrenzen. Nach Einzeichnen der Halbierungskurve ergibt ihr Schnittpunkt mit der Begrenzungslinie von Fraktion II die Überschneidungspunkte mit den beiden übrigen Hauptkomponenten. Senkrecht über den Schnittpunkten von Halbierungskurve und Begrenzungslinie liegen auf der Gradientenkurve die Punkte, die die Grenze zwischen zwei Fraktionen bilden. Da die Gradientenkurve Differenzwerte darstellt, werden die beiden zugehörigen Meßwerte aufgesucht und der in der Mitte dazwischen liegende Meßwert als korrespondierender Konzentrationswert angenommen.

Wenn die absolute Eiweißkonz. jeder einzelnen Fraktion feststeht, kann der prozentuale Anteil an der Gesamteiweißkonzentration errechnet werden.

H.J. Antweiler gibt in der von ihm herausgegebenen Arbeitsanleitung für das Mikroelektrophoresegerät an, daß durch Drehen der Meßtrommel um 129 Skalenteile der Brechwert einer 1 %igen Proteinlösung kompensiert wird. Dieses ist ein empirischer Wert, der es ermöglicht, die Eiweißkonzentration des untersuchten Extraktes zu bestimmen. Auf analogem Weg wird die Eiweißkonzentration der Fraktionen I bis III ermittelt. Da der in der Küvette untersuchte Muskelextrakt 1:3 verdünnt worden ist, muß das Ergebnis mit 3 multipliziert werden, um die Gewebkonzentration an löslichen Proteinen festzustellen.

E r g e b n i s s e

In unserer Versuchsanordnung verwendeten wir als geeignetes Extraktionsmittel die Weber-Lösung.

An unseren elektrophoretischen Diagrammen ist deutlich eine Teilung in 3 Hauptkomponenten zu erkennen. Diese 3-Teilung ist auch an den Pherogrammen der Dubuissou-Schule, die den quergestreiften Skelettmuskel einer elektrophoretischen Untersuchung unterzogen, regelmäßig zu finden.

Das von uns gewählte Verfahren der Mikroelektrophorese nach Antweiler erlaubt es nicht, ohne weiteres die Identität der einzelnen Eiweißkomponenten des Myokards mit denen des Skelettmuskels gleichzusetzen; da die Antweiler-Methode eine Messung der Wanderungsgeschwindigkeit nicht ermöglicht.

Cruck und Crepax führten Untersuchungen mit einer modifizierten Tiselius-Longworth-Methode am Myokard des Rindes durch. Die Ergebnisse, die das elektrophoretische Bild ergab, zeigten im wesentlichen keinen Unterschied im Vergleich zu denen des Skelettmuskels. Beide Autoren übernahmen die von Dubuissou für den Skelettmuskel angegebene Nomenklatur für das Myokard, da es in qualitativer Hinsicht keinen Unterschied zum Skelettmuskel aufzuweisen schien.

Auf Grund eigener Versuche halten wir uns für berechtigt, die von Dubuissou angegebene Bezeichnung der Eiweißfraktionen auch auf unsere Pherogramme aus Myokard zu übertragen. In zahlreichen orientierenden Versuchen konnten wir indirekt nachweisen, daß die Eiweißfraktionen, die in der Gruppe II wandern, mit Actomyosin und Myosin identisch sind. In Tabelle I wurde gezeigt, daß die Proteine des Myosinkomplexes bei einer Extraktionslösung von einer Ionenstärke $\mu 0,15$ nicht in Lösung gehen. Wählten wir eine Pufferlösung von der Ionenstärke $\mu 0,15$ als Extraktionsmittel, so zeigte sich, wie zu erwarten war, im Pherogramm das Fehlen der Komponente II.

Weitere Versuche, bei denen die Extraktionszeit variiert wurde, ergaben in unseren Pherogrammen die jeweils zu erwartende Veränderung in der Komponente II. Mit der Dauer der Extraktionszeit verschiebt sich das Verhältnis Actomyosin (α -Myosin) / L-Myosin (β -Myosin) zugunsten des Actomyosin. In der Tat zeigten Extrakte nach 14-stündiger Extraktionszeit eine hohe, gut ausgeprägte α -Myosin-Zacke und nur eine angedeutete β -Myosin-Zacke im elektrophoretischen Bild. Extrakte mit kurzer Extraktionszeit zeigten, daß

das β -Myosin den größten Teil des Myosinkomplexes ausmacht und das α -Myosin nur in geringer Menge zu finden ist.

Ohne Zweifel lassen sich auf Grund des charakteristischen Kurvenzuges und des Verhältnisses der Wanderungsgeschwindigkeit der 3 Hauptkomponenten zueinander Anhaltspunkte für eine Identität mit den von Dubuissou am Skelettmuskel angegebenen Fraktionen finden.

Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen am normalen und hypertrophierten Kaninchenherzen

1) li. Ventrikel

Die weiter unten gezeigten Kurven sind Elektrophorese-Diagramme (auf interferometrischem Wege ermittelt) des li. Ventrikels. Ihnen gegenübergestellt sind vergrößerte Philpot-Svensson-Aufnahmen. Der Oberrand des vergrößerten Kurvenzuges wurde nachgezeichnet, da die fotografischen Aufnahmen selbst infolge Unschärfe zur direkten Reproduktion ungeeignet waren. Es werden hier nur Diagramme der ascendierenden Fronten bei anodischer Wanderungsrichtung gezeigt. Die Spalteinstellung der Schlierenoptik wurde während der ganzen Versuchsserie nicht geändert.

Normaltier Nr. N II
interferometrische Ablesung

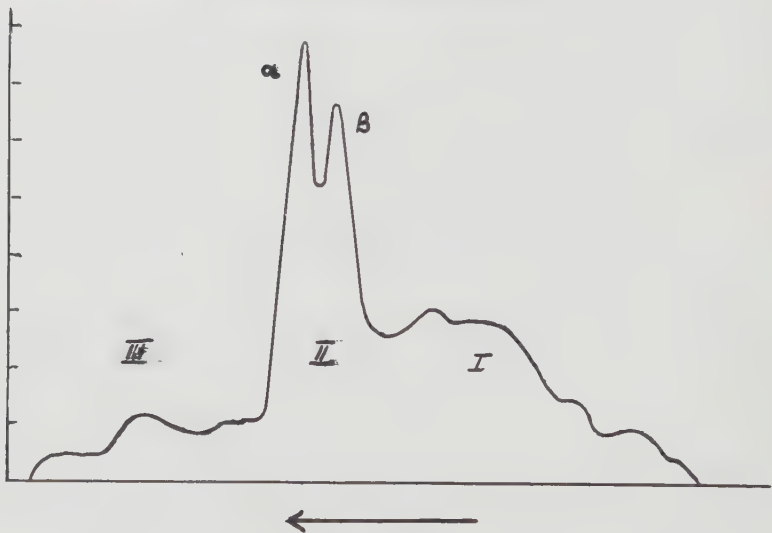


Abb. 1. Linker Ventrikel. Mikroelektrophorese-Diagramm (anod. Wanderung) eines Weberextraktes; Extraktionszeit 1^h, für Dialyse und Phorese Pufferlösung: Ionenstärke 0,35 pH 7,4. Elektrophorese-dauer: 60 Min., 36 V/2,5 mA, Temp. 8^o C.

(Philpot-Svensson-Aufnahme)

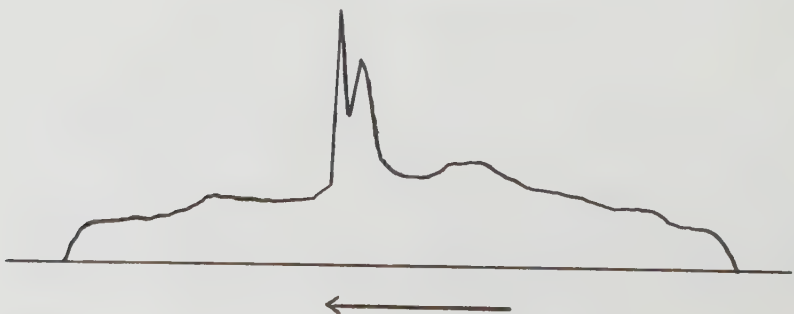


Abb. 2.

Operiertes Tier Nr. 205
interferometrische Ablesung

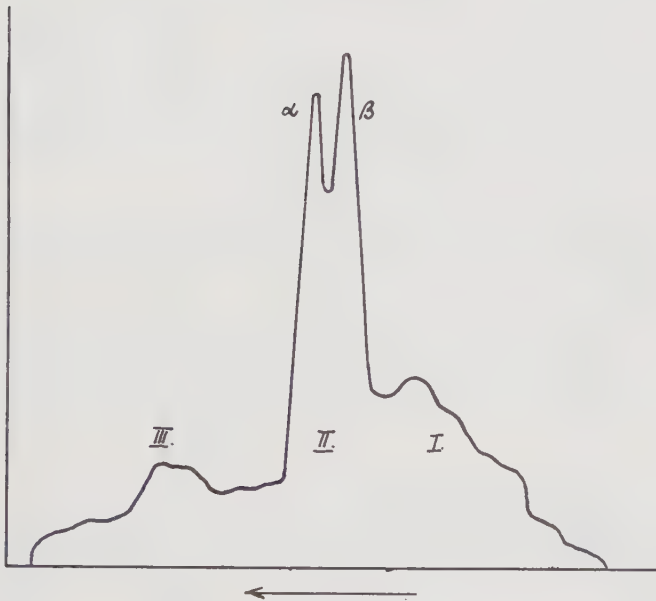


Abb. 3. Bedingungen wie bei Abb. 1.

(Philpot-Svensson-Aufnahme)

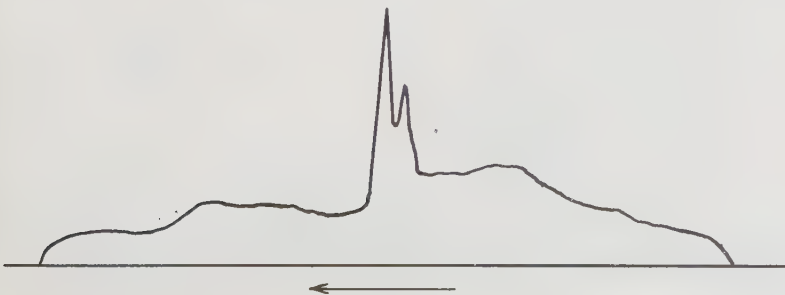


Abb. 4.

Regelmäßig weisen alle Pherogramme, wie bereits oben erwähnt, eine Aufteilung in 3 Hauptkomponente auf. Extrakte aus normalem linken Ventrikel zeigen im Vergleich zu Extrakten aus hypertrophischem linken Ventrikel keinen grundlegenden Unterschied im elektrophoretischen Bild.

Die am schnellsten im elektrischen Feld wandernde Komponente III stellt das Myoalbumin dar, das wahrscheinlich aus mehreren Fraktionen besteht. Deutlich abgrenzbar folgt als nächste Komponente die Gruppe II, der Myosinkomplex, der zwei Gipfel zeigt, die dem α -Myosin (= Actomyosin) und dem β -Myosin entsprechen.

Schwierigkeiten bereitet meistens die Abtrennung der Hauptfraktion I von der Gruppe II. Diese Komponente I stellt das Myogen dar und besteht aus mehreren Fraktionen.

Anhand unserer Auswertung ergaben sich folgende Mittelwerte - Konzentration im Extrakt. Die Werte sind bei einer Umrechnung auf die Gewebskonzentration mit 3 zu multiplizieren, da der untersuchte Extrakt eine Verdünnung 1 : 3 aufweist.

Normaltiere - li. Ventrikel (8 Versuche)

Gesamtlösliches Eiweiß abs.	1,89	100 %
davon entfallen auf:		
Myogen (I)	0,859	45,3 %
Myosinkomplex (II)	0,803	42,4 %
Myoalbumin (III)	0,232	12,3 %

Das Verhältnis	<u>Gesamtlösliches Eiweiß</u>
	Myosinkomplex

beträgt 2,32. Die angeführten Mittelwerte wurden aus Untersuchungen an 8 Kaninchen ermittelt. Im Mittel betrug bei diesen Tieren

das Gewicht der Tiere	3,51 kg
das Gewicht der Herzen	8,82 g
das Gewicht der Ventrikel	7,37 g
die Relation <u>Herzgewicht</u>	
<u>Tiergewicht</u>	2,53
die Druckamplitude der A. carotis vor Sektion	23 mmHg

Unterschiede zwischen normalem und hypertrophischem li. Ventrikel bestehen in der Gesamteiweißkonzentration und dem Verhältnis der Komponenten zueinander.

Operierte Tiere - li. Ventrikel

Gesamtlösliches Eiweiß abs.	2,12	100 %
davon entfallen auf		
Myogen (I)	0,908	= 42,8 %
Myosinkomplex (II)	0,941	= 44,4 %
Myoalbumin (III)	0,272	= 12,8 %

Das Verhältnis

$$\frac{\text{Gesamtlösliches Eiweiß}}{\text{Myosinkomplex}}$$

beträgt 2,25. Auch diese Mittelwerte wurden aus einer Versuchsserie von 8 Tieren, denen 24 Wochen vor der Sektion ein Aortenklappenvitium gesetzt worden war, ermittelt. Im Mittel betrug bei diesen Tieren

das Gewicht der Tiere	3,470 kg
das Gewicht der Herzen	13,1 g
das Gewicht der Ventrikel	10,7 g
die Relation $\frac{\text{Herzgewicht}}{\text{Tiergewicht}}$	3,76
die Druckamplitude der A. carotis vor Sektion	53 mm Hg.

In den folgenden Tabellen sind die einzelnen Versuchsergebnisse angeführt, aus denen die vorerwähnten Mittelwerte errechnet wurden.

Konzentration des löslichen Eiweißes

Normaltiere - Li. Ventrikel

Tier Nr.		Gesamtl. Eiweiß	Myogen I	Myosin II	Myoalb. III	Gesamtl. Eiw. Myosin
N I	abs.	1,88	0,836	0,820	0,225	2,29
	in %	100	44,4	43,6	12	
N II	abs.	1,83	0,895	0,731	0,206	2,5
	in %	100	48,8	39,8	11,4	
N IV	abs.	1,94	0,930	0,754	0,256	2,57
	in %	100	47,9	39	13,1	
N V	abs.	1,84	0,764	0,837	0,246	2,2
	in %	100	41,4	45,3	13,3	
N VII	abs.	1,96	0,920	0,780	0,257	2,51
	in %	100	47,2	39,7	13,1	
N 123	abs.	2,00	0,888	0,877	0,235	2,28
	in %	100	43,7	44,1	12,2	
N 125	abs.	1,90	0,852	0,825	0,223	2,3
	in %	100	44,8	43,4	11,8	
S 332	abs.	1,80	0,792	0,800	0,208	2,25
	in %	100	44,1	44,3	11,6	

=====

Mittel-

werte	abs.	1,89	0,859	0,803	0,232	2,36
	in %	100	45,3	42,4	12,3	

Konzentration des löslichen Eiweißes

Hypertrophische Tierherzen - li. Ventrikel

Tier Nr.		Gesamtl. Eiweiß	Myogen I	Myosin II	Myoalb. III	Gesamtl. Eiw. Myosin
205	abs.	2,06	0,896	0,917	0,247	2,24
	in %	100	43,4	44,6	12	
210	abs.	2,11	0,861	1,001	0,249	2,11
	in %	100	40,8	47,4	11,8	
217	abs.	2,13	0,916	0,981	0,233	2,17
	in %	100	43,1	46,1	10,9	
220	abs.	2,20	0,955	0,970	0,276	2,27
	in %	100	43,3	44,2	12,5	
221	abs.	2,04	0,836	0,876	0,328	2,33
	in %	100	41	43	16	
222	abs.	2,17	0,976	0,924	0,274	2,35
	in %	100	45	42,5	12,6	
224	abs.	2,13	0,922	0,923	0,292	2,31
	in %	100	43,1	43,2	13,7	
234	abs.	Herz in Kontraktur nicht völlig ausgeblutet				
	in %					

Mittelwerte

abs.	2,12	0,908	0,941	0,272	2,25
in %	100	42,8	44,4	12,8	

Beim Betrachten der Ergebnisse drängt sich die Frage auf: Wird bei der 1-stündigen Extraktion mit "Weber-Lösung" das gesamte lösliche Eiweiß extrahiert, oder bedarf es hierzu einer längeren, intensiveren Extraktion? Auch die Art der Zerkleinerung ist für die Ausbeute von Bedeutung. Parallel zu den elektrophoretischen Untersuchungen wurde von denselben Kaninchenherzen das lösliche Eiweiß nach der Kjeldahl-Methode im homogenisierten Gewebe und nach 24-stündiger Extraktion unter Zusatz von ATP bestimmt. (Tenderich Diss.) Die Kjeldahl-Methode ergab umgerechnet auf das Feuchtgewicht bei den Kontrollen 6,88 g % (12 Tiere) und bei den hyper-trophischen Herzen 6,6 g % (11 Tiere). Im Vergleich zu den etwas niedriger liegenden, auf elektrophoretischem Wege gewonnenen Werten, zeigt sich keine sehr große Differenz.

Vergleich li. Ventrikel, re. Ventrikel und Vorhofmyokard

Neben Versuchen am li. Ventrikel wurden zu Vergleichszwecken auch Versuche am re. Ventrikel von Normal- und operierten Tieren durchgeführt. Ein formaler Unterschied zwischen normalem li. Ventrikel und normalem re. Ventrikel konnte nicht beobachtet werden. Auch am re. Ventrikel zeigte sich die typische Unterteilung der Fraktionen in 3 Gruppen. Die Bezeichnung der Fraktionen erfolgte in Analogie zu den Pherogrammen, erhalten aus Extrakten des li. Ventrikels. Auffällig war lediglich, daß die Gradientenkurve des re. Ventrikels in der Gruppe II nicht so steil und hoch aufragte, wie die des li. Ventrikels. Ein Unterschied im elektrophoretischen Bild zwischen Myokard eines re. Ventrikels von Normaltier im Vergleich zu operierten Tieren konnte nicht festgestellt werden.

Operiertes Tier Nr. 210
interferometrische Ablesung

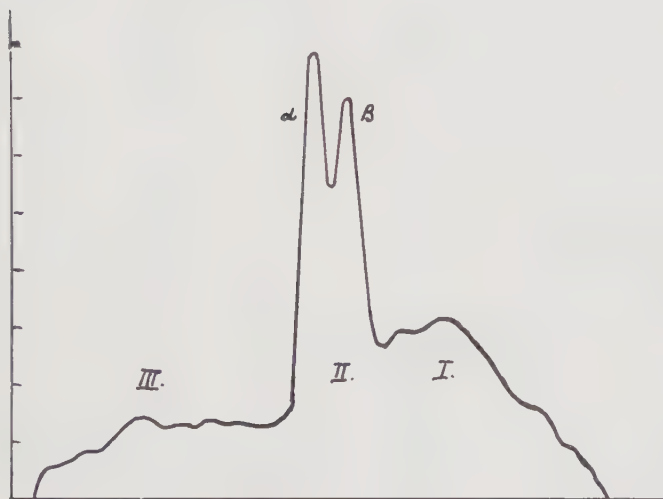


Abb. 5. Rechter Ventrikel. Mikroelektrophoresediagramm (anod. Wanderung) eines Weberextraktes, Extraktionszeit 1^h, für Dialyse und Phorese
Pufferlösung: Ionenstärke 0,35 pH 7,4. Elektrophoresedauer: 60 Min.,
36 V/2,5 mA, Temp. 8° C.

Normaltier Nr. N II
interferometrische Ablesung

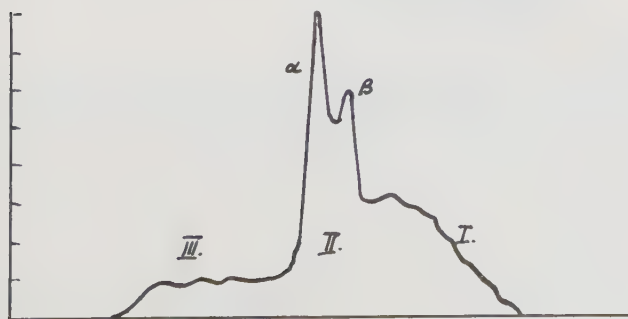


Abb. 6. Bedingungen wie bei Abb. 5.

An den Pherogrammen des re. Ventrikels zeigte sich auch die Schwierigkeit, die Hauptfraktion I von der Gruppe II zu trennen.

Die Auswertung der Pherogramme von der Untersuchung an 6 Normaltierherzen ergibt folgende Mittelwerte:

Normaltiere - re. Ventrikel

Gesamtlösliches Eiweiß abs.	1,59	= 100 ‰
davon entfallen auf		
Myogen (I)	0,730	= 45,8 ‰
Myosinkomplex (II)	0,646	= 40,4 ‰
Myoalbumin (III)	0,222	= 13,8 ‰

Das Verhältnis

$$\frac{\text{Gesamtlösliches Eiweiß}}{\text{Myosinkomplex}}$$

beträgt 2,46.

Die Untersuchungen am re. Ventrikel von 6 operierten Tieren zeigten folgende Mittelwerte:

Operierte Tiere - re. Ventrikel

Gesamtlösliches Eiweiß abs.	1,70	= 100 ‰
davon entfallen auf		
Myogen (I)	0,756	= 44,2 ‰
Myosinkomplex (II)	0,704	= 41,4 ‰
Myoalbumin (III)	0,246	= 14,4 ‰

Das Verhältnis

$$\frac{\text{Gesamtlösliches Eiweiß}}{\text{Myosinkomplex}}$$

beträgt 2,42.

In den nun folgenden Tabellen sind die einzelnen Versuchsergebnisse angeführt, aus denen die Mittelwerte entnommen wurden.

Konzentration des löslichen Eiweißes

Normaltiere - re. Ventrikel

Tier Nr.		Gesamtl. Eiweiß	Myogen I	Myosin II	Myoalb. III	Gesamtl. Eiweiß
N I	abs.	1,51	0,650	0,627	0,233	2,41
	in %	100	43,1	41,5	15,4	
N II	abs.	1,51	0,670	0,650	0,191	2,32
	in %	100	44,4	43	12,6	
N III	abs.	1,5	0,710	0,568	0,223	2,64
	in %	100	47,5	37,9	14,7	
N IV	abs.	1,6	0,786	0,589	0,228	2,72
	in %	100	49	36,7	14,3	
N VI	abs.	1,76	0,865	0,695	0,213	2,53
	in %	100	49,1	39,4	11,5	
N VIII	abs.	1,68	0,700	0,747	0,246	2,25
	in %	100	41,3	44,2	14,5	

Mittelwerte

abs.	1,59	0,730	0,646	0,222	2,46
in %	100	45,8	40,4	13,8	

Konzentration des löslichen Eiweißes

Operierte Tiere - re. Ventrikel

Tier Nr.		Gesamtl. Eiweiß	Myogen I	Myosin II	Myoalb. III	Gesamtl. Eiw. Myosin
210	abs.	1,87	0,845	0,709	0,226	2,51
	in %	100	47,4	39,9	12,7	
217	abs.	1,66	0,735	0,690	0,235	2,41
	in %	100	44,2	41,5	14,3	
221	abs.	1,86	0,822	0,751	0,286	2,47
	in %	100	44,1	40,4	15,5	
222	abs.	1,69	0,742	0,710	0,238	2,38
	in %	100	43,9	42	14,1	
224	abs.	1,62	0,750	0,632	0,238	2,56
	in %	100	46,2	39,1	14,7	
234	abs.	1,63	0,645	0,732	0,253	2,23
	in %	100	39,8	44,8	15,4	
=====						
Mittelwerte						
	abs.	1,70	0,756	0,704	0,246	2,42
	in %	100	44,2	41,4	14,4	

In einer weiteren Versuchsserie wurden die Vorhöfe von normalen und hypertrophischen Kaninchenherzen elektrophoretisch untersucht. Eine Einteilung der Pherogramme in 3 Hauptfraktionen läßt sich in Analogie zum li. und re. Ventrikel auch bei den Vorhofdiagrammen nachweisen. Jedoch zeigen die Vorhofdiagramme im Vergleich zu den Ventrikelbildern einen differierenden Kurvenzug. Auffällig ist zunächst ein massiverer Gipfel in der Gruppe III, die dem Myoalbumin entspricht. Weiter ist die Fraktion II, verglichen mit den Ventrikelextrakten, weniger steil ansteigend und auch nicht so hoch aufragend. Eine ausgeprägte Aufteilung in 2 Gipfel, wie sie regelmäßig bei Ventrikelextrakten in der Gruppe II zu beobachten ist, konnte auch nach längerer Laufzeit an Vorhofdiagrammen nicht gezeigt werden.

Besondere Schwierigkeiten bereitete bei Vorhofdiagrammen die Trennung von Gruppe I und II, da meist ein fließender Übergang der Hauptkomponente II in die Hauptkomponente I zu beobachten war. Aus diesem Grund faßten wir bei der Auswertung der Vorhofdiagramme die Gruppe I und die Gruppe II, die dem $\alpha + \beta$ -Myosin entspricht, zusammen.

Normaltier Nr. N 123
interferometrische Ablesung

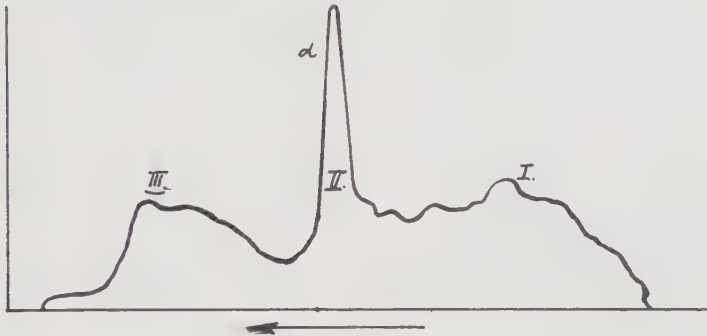


Abb. 7. Vorhöfe. Mikroelektrophorese-Diagramm (anod. Wanderung) eines Weberextraktes. Extraktionszeit 1^h, für Dialyse und Phorese Pufferlösung: Ionenstärke 0,35 pH 7,4 Elektrophoresedauer: 60 Min., 36 V/2,5 mA Temp. 8° C.

Operiertes Tier Nr. 222
interferometrische Ablesung

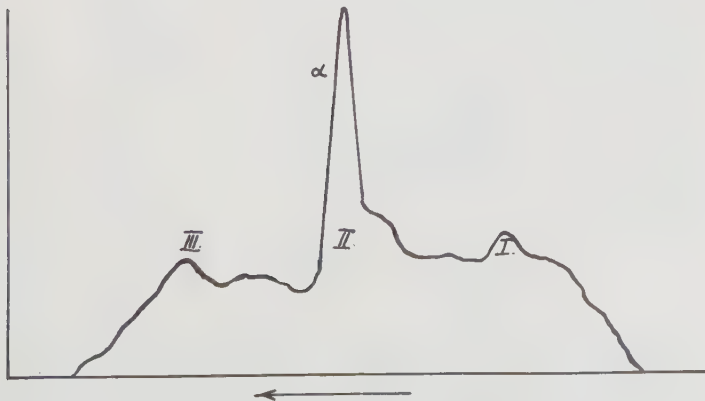


Abb. 8. Bedingungen wie bei Abb. 7.

Aus den gezeigten Kurven ist zu ersehen, daß die Vorhöfe von Normaltieren verglichen mit denen von operierten Tieren keinen formalen Unterschied zeigen. Die Gesamteiweißkonzentrationen und das Verhältnis der Fraktionen zueinander zeigen jedoch beim Vergleich geringe Unterschiede.

Folgende Mittelwerte ließen sich aus den Untersuchungen von 6 Vorhofextrakten ermitteln.

Normaltiere - Vorhöfe

Gesamtlösliches Eiweiß abs.	1,13	=	100 %
davon entfallen auf			
Myogen (I) + Myosinkomplex	0,875	=	76,9 %
Myoalbumin (III)	0,263	=	23,1 %

Das Verhältnis

$$\frac{\text{Gesamtlösliches Eiweiß}}{\text{Myoalbumin}}$$

beträgt 4,3.

Diesen Ergebnissen stehen gegenüber die Untersuchungen der Vorhöfe von operierten Tieren.

Operierte Tiere - Vorhöfe

Gesamtlösliches Eiweiß abs.	1,23	=	100 %
davon entfallen auf			
Myogen (I) + Myosinkomplex	0,883	=	71,7 %
Myalbumin (III)	0,347	=	28,3 %

Das Verhältnis

$$\frac{\text{Gesamtlösliches Eiweiß}}{\text{Myoalbumin}}$$

beträgt 3,54.

Konzentrationen des löslichen Eiweißes

Normaltiere - Vorhöfe

Tier Nr.		Gesamtl. Eiweiß	Myogen + Myosin	Myoalb. III	Gesamtl. Eiw. Myoalbumin
N 123	abs.	1,15	0,900	0,256	4,5
	in %	100	77,9	22,1	
N 125	abs.	1,12	0,849	0,271	4,14
	in %	100	75,8	24,2	
N 124	abs.	1,14	0,877	0,263	4,33
	in %	100	77	23	

=====

Mittelwerte

abs.	1,13	0,875	0,263	4,3
in %	100	76,9	23,1	

Operierte Tiere - Vorhöfe

Tier Nr.		Gesamtl. Eiweiß	Myogen + Myosin	Myoalb. III	Gesamtl. Eiw. Myoalbumin
214	abs.	1,19	0,875	0,320	3,72
	in %	100	73,3	26,7	
221 + 224	abs.	1,19	0,811	0,379	3,14
	in %	100	68,2	31,8	
222	abs.	1,30	0,964	0,342	3,80
	in %	100	73,7	26,3	

=====

Mittelwerte

abs.	1,23	0,883	0,347	3,55
in %	100	71,7	28,3	

Neben den vorgenannten Versuchsreihen wurden auch noch orientierende Versuche gemacht, bei denen die Extraktions- und Dialysebedingungen variiert wurden.

Bei den folgenden Versuchen gingen wir von den Beobachtungen aus, die Szent-Györgyi machte, wonach zwischen "short time extraction" und "long time extraction" ein grundlegender Unterschied zu beobachten ist. Szent-Györgyi stellte auf präparativem Wege fest, daß Extrakte nach kurzer Extraktionszeit viel L-Myosin und wenig Actomyosin enthalten; während nach langer Extraktionszeit reichlich Actomyosin und geringe Mengen L-Myosin gefunden werden. Wir konnten mit Hilfe der Elektrophorese diese Beobachtung bestätigen. Unsere Extrakte zeigten nach 1/2-stündiger Extraktionszeit deutlich eine niedrige kaum ausgeprägte α -Myosin-Fraktion (Actomyosin), während das β -Myosin (L-Myosin) den größten Teil der Gruppe II ausmachte. Wird die Extraktionszeit auf 15 Stunden verlängert, so zeigt sich im Pherogramm deutlich eine steil aufragende hohe α -Myosin-Zacke und nur eine kleine, weniger deutlich ausgeprägte β -Myosin-Zacke.

In weiteren Versuchen konnten wir zeigen, daß sich nach entsprechender Verarbeitung des Muskelextraktes im elektrophoretischen Diagramm in der Gruppe II nur das L-Myosin zeigt. Es wurden Versuche mit Extrakten aus Vorhöfen und li. Ventrikel gemacht. Zunächst stellten wir einen Extrakt für die Elektrophorese in der Weise her, wie in dem Abschnitt Methodik beschrieben worden ist. Dann teilten wir den Extrakt. Um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, wurde die eine Hälfte sofort einer elektrophoretischen Untersuchung unterzogen, während die andere Hälfte gegen eine ATP-haltige Pufferlösung dialysiert wurde (50 ccm Phosphatpuffer Ionenstärke μ 0,45 + 150 mg ATP). Nach 12 Stunden wurde der Extrakt aus dem Dialysierschlauch in kleine Probegläser gefüllt. Beim Betrachten des Extraktes vor einem dunklen Hintergrund zeigte sich deutlich, daß der ganze Muskelextrakt mit hauchdünnen Fadenpartikeln durchsetzt war. Nach kurzem Zentrifugieren bei 4500 Umdrehungen/min. sedimentierten die Fadenpartikelchen. Der klare Überstand wurde abpipettiert und dann elektrophoretisch untersucht. Die so erhaltenen Pherogramme zeichneten sich dadurch aus, daß an Stelle der 2 Gipfel des Actomyosins und Myosins ein einziger breiter Gradient erschien, der seiner Stellung im Pherogramm nach als Myosin anzusprechen ist.

Es ist bekannt, daß beim Zusatz von ATP zu Lösungen von Actomyosin die Viscosität, Strömungsdoppelbrechung und Lichtstreuung abnimmt. ATP bewirkt eine Spaltung des gelösten Actomyosins in die Komponenten Myosin und Actin.

li. Ventrikel Nr. N 125

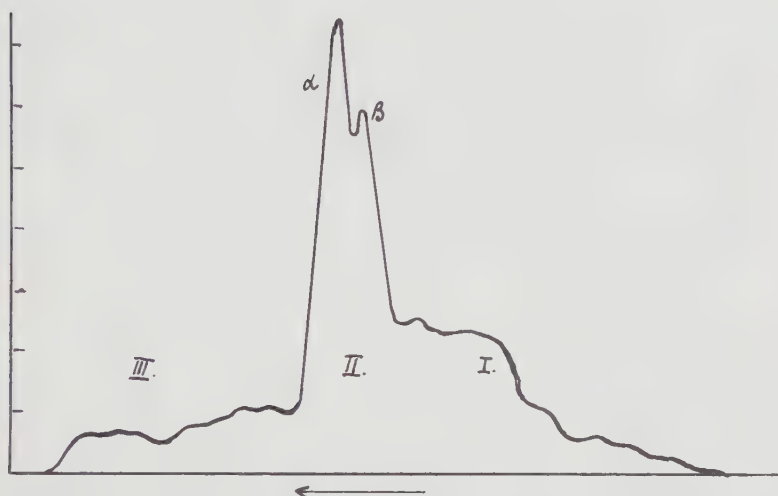


Abb. 9. Linker Ventrikel. Mikroelektrophorese-Diagramm (anod. Wanderung) eines Weberextraktes. Extraktionszeit 14^h, für Dialyse und Phorese Pufferlösung: Ionenstärke 0,45 pH 7,4, Elektrophoresedauer 100 Min., 29 V/2,5 mA Temp. 10^o C.

Der gleiche li. Ventrikel + ATP-Zusatz

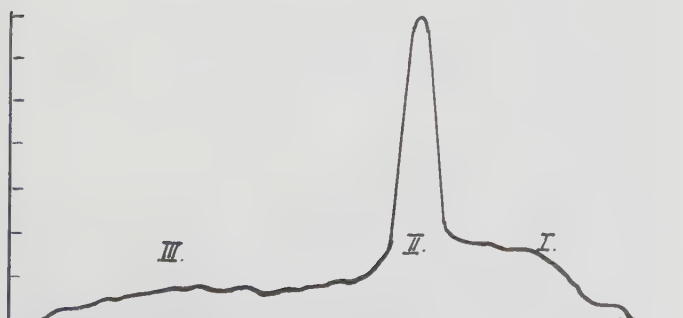


Abb. 10. Für Dialyse und Phorese Pufferlösung: Ionenstärke 0,45 pH 7,4 + ATP-Zusatz. Sonst Bedingungen wie bei Abb. 9.

Auf Grund dieser Ergebnisse sind wir zu der Annahme gekommen, daß die Fadenpartikelchen im Extrakt nach ATP-Dialyse Actin darstellen. Das Actin muß von der globären Form (G-Actin) in die fibrilläre Form (F-Actin) übergegangen und dann ausgefallen sein. Fehlt in einem Muskelextrakt jedoch das Actin, so kann sich das Produkt aus F-Actin und L-Myosin = Actomyosin nicht bilden. Das L-Myosin bleibt in reiner Form im Extrakt und kann im elektrophoretischen Diagramm als β -Myosin nachgewiesen werden.

Man sollte die sedimentierten Fadenpartikelchen einer elektronenoptischen Untersuchung unterziehen, um den exakten Beweis zu erbringen, daß es sich um F-Actin handelt.

Diskussion

Bei den vorliegenden Untersuchungen werden vor allem zwei Fragen näher beleuchtet:

1. Ist eine Veränderung in der Proteinzusammensetzung der Ventrikel zwischen normalen und hypertrophierten Kaninchenherzen zu beobachten?
2. Zeigen der linke und der rechte Ventrikel sowie die Vorhöfe von Kaninchenherzen Unterschiede im elektrophoretischen Bild?

Wir dürfen uns nicht darüber hinwegtäuschen lassen, daß unsere mikroelektrophoretischen Untersuchungen keine erschöpfende Antwort auf einen so weit gespannten Fragenkomplex geben können; denn mit der von uns angegebenen Versuchsanordnung ist es nur in begrenztem Maße möglich, die Fraktionen quantitativ zu bestimmen. Auf Grund des charakteristischen Kurvenzuges hielten wir uns, wie bereits im Abschnitt Ergebnisse ausgeführt, für berechtigt, eine Einteilung der Fraktionen in Anlehnung an die Nomenklatur der Dubuisson-Schule vorzunehmen. Sowohl Skelettmuskel - wie auch Myokardpherogramme zeigen die ausgeprägte Unterteilung in 3 Hauptkomponenten, ob sie nun nach der Tiselius-Longsworth- oder Antweiler-Methode erhalten wurden.

Die am schnellsten zur Anode wandernde Komponente ist das Myoalbumin (III). Im Gegensatz zu den Pherogrammen, die Dubuisson und Mitarbeiter erhalten haben, zeigten unsere Pherogramme regelmäßig neben einem größeren Gipfel mehrere kleine Fraktionen in der Gruppe III. Das Myoalbumin ist ein Bestandteil des Sarkoplasmas und stellt nach Cruck und anderen Autoren möglicherweise ein Reserveprotein dar, das, wenn es die Umstände erfordern, ein höher differenziertes und mehr spezialisiertes Protein aufbauen kann. Nach

Crepax ist der embryonale und atrophische Muskel besonders reich an Myoalbumin.

Als nächste langsamer wandernde Hauptkomponente zeigt sich in der Gruppe II der Myosinkomplex. In diesem Abschnitt wirken sich Änderungen der Extraktions- und Dialysebedingungen besonders deutlich aus, wie in den orientierenden Versuchen gezeigt wurde. Bei Verwendung einer Ionenstärke von 0,35 wurde die interferometrische Ablesung der Elektrophorese öfters durch eine Trübungszone erschwert, die sich, wie in der Philpot-Svensson-Optik zu sehen war, vom aufsteigenden Ast des α -Myosin in massiver Form bis zum Ende des Kurvenbildes zeigte. U.E. handelte es sich um Actomyosinpartikel, die ausgefallen waren. Wählten wir eine höhere Ionenstärke, so zeigte sich keine Trübungszone. Bei einer Ionenstärke von μ 0,35 ist das Actomyosin nahe an dem Punkt, an dem es vom Sol- in den Gelzustand übergeht.

Unsere Ventrikel-Pherogramme, gewonnen nach 1-stündiger Extraktion zeigten in der Regel 2 ausgeprägte Fraktionen (α -Myosin und β -Myosin).

Eine dritte Fraktion, das Myosin γ , das nach Dubuisson in der Gruppe II am Übergang zur Gruppe I wandert, ließ sich in unseren Pherogrammen nicht mit Sicherheit abgrenzen. Beim Betrachten eines großen Kurvenmaterials stellten wir fest, daß sich im absteigenden Ast des β -Myosins, nahe am Übergang in die Hauptkomponente I, eine weitere kleine Fraktion in Form einer Ausbuchtung des Kurvenzuges zeigte. Man könnte natürlich zu der Annahme neigen, daß diese kleine Fraktion dem Myosin γ (Kontraktin) entspricht. Andererseits könnte diese kleine Fraktion aber auch eine Überlagerung mit einer Komponente der Myogenfraktion darstellen. Einige Autoren beschreiben die Gruppe I als einheitlichen Gipfel. In unseren Ventrikel-Pherogrammen ließen sich jedoch regelmäßig im Myogenanteil mehrere, bis zu 7 Fraktionen, nachweisen, die alle eine nur wenig voneinander differierende Wanderungsgeschwindigkeit besitzen.

Eine deutlichere Auftrennung der einzelnen Fraktionen im Myogenbereich kann erzielt werden, wenn man eine Extraktionslösung von niedriger Ionenstärke wählt. Allerdings fehlt dann, wie bereits erwähnt, der Myosinkomplex.

Bei den Untersuchungen am normalen Kaninchenmyokard stellten wir eine Abnahme der Totalkonzentration des löslichen Eiweißes vom li. über den re. Ventrikel bis zu den Vorhöfen fest. Bei der Gegenüberstellung von li. und re. Ventrikel zeigte letzterer einen absolut geringeren Gehalt an fibrillären Eiweißkörpern. Dieser Unterschied ist eine Bestätigung für die Ergebnisse von Kováts,

der ebenfalls eine niedrigere Konzentration der kontraktilen Proteine im re. Ventrikel feststellte. Ferner ist im re. Ventrikel der Gehalt an Myogen absolut verringert, während das Myoalbumin in geringerem Maße absolut vermehrt ist. Vergleicht man die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen des li. und re. Ventrikels miteinander, so ergibt sich kein sicherer Unterschied.

Da wir bei den Vorhöfen gezwungen waren, eine von den Ventrikeln unterschiedliche Einteilung der Fraktionen vorzunehmen, ließ sich nur die Komponente III, das Myoalbumin, zu Vergleichszwecken heranziehen. Dabei ergab sich, daß die Vorhöfe einen absolut größeren Myoalbuminanteil besitzen als die Ventrikel. Die Komponenten I und II zusammengefaßt ergaben bei den Vorhöfen 76,9 %, beim li. Ventrikel 87,7 % und beim re. Ventrikel 86,2 % des gesamtlöslichen Eiweißes. Der geringere prozentuale Anteil der Gruppen I und II beruht bei den Vorhöfen wahrscheinlich auf dem geringen Myosin-Gehalt. Unter sonst gleichen Bedingungen ist in Vorhofextrakten ein größerer Teil des extrahierten Myosins an Actin gebunden, als in Ventriklextrakten. Im elektrophoretischen Bild eines Vorhofextraktes ist die Hauptfraktion II im Vergleich zu den Ventrikelfrophogrammen deutlich verkleinert. Diese Beobachtung stimmt mit der von Kovats überein, der in den Vorhöfen die geringsten Anteile an fibrillären Proteinen fand.

Die Herzen der operierten Tiere zeigen in den meisten Fällen schon makroskopisch eine deutliche Vergrößerung gegenüber normalen Herzen. Ein brauchbares Maß für die Hypertrophie ergibt das Verhältnis

$$\frac{\text{Herzgewicht}}{\text{Tiergewicht}}$$

Bei Normaltieren betrug diese Relation im Durchschnitt 2,53, bei operierten Tieren 3,76. Bei den operierten Tieren ist im Gegensatz zu den kjeldahlometrischen Bestimmungen eine geringe Zunahme der gesamtlöslichen Eiweißkonzentration in allen drei Herzabschnitten festzustellen. Als Ursache für die Diskrepanz kommt wohl in erster Linie die etwas verschiedene Art der Zerkleinerung des Gewebes in Frage. Während für die Elektrophorese grob zerkleinertes Gewebe verwendet wurde, diente für die kjeldahlometrischen Bestimmungen homogenisiertes Myokard zur Extraktion. Die im ganzen niedrigeren Werte der elektrophoretisch bestimmten Konzentrationen im Gewebe dürfte hauptsächlich auf unvollständiger Extraktion der schwerlöslichen kontraktilen Proteine beruhen.

Der linke Ventrikel weist eine Zunahme der fibrillären Eiweißkörper auf. Die Konzentration des Myoalbumins ist im hypertrophierten linken Ventrikel ebenfalls größer. Das Myogen steigt in seiner Absolutkonzentration nur geringfügig

an. Der Myoalbumin- und Myosinanteil des hypertrophierten linken Ventrikels sind nicht nur absolut, sondern vor allem prozentual vermehrt. Die Myogen-Fraktion ist entsprechend verringert.

Das Aortenklappenvitium bewirkt primär eine Hypertrophie des linken Ventrikels. Eine Hypertrophie des rechten Ventrikels stellt sich erst nach Insuffizienz des linken Ventrikels ein. Bei großen Aortenklappenvitien kann es sekundär zu einer mehr oder weniger starken Hypertrophie des rechten Ventrikels kommen. Dies wäre ein Erklärungsversuch für die minimalen Änderungen in der Proteinzusammensetzung des rechten Ventrikels von operierten Tieren. Dieser zeigt bei hypertrophischen Kaninchenherzen eine geringfügige absolute Erhöhung der fibrillären Proteine, des Myoalbumins und des Myogens auf.

Im Gegensatz zu diesen weniger auffallenden Unterschieden am rechten Ventrikel zeigen die Vorhöfe von operierten Tieren deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung ihrer Proteine. Diese Tatsache läßt sich ohne weiteres daraus ableiten, daß sich der linke Vorhof auf Grund des Aortenklappenvitiums einer erheblichen Mehrarbeit gegenüber sieht; zum Teil durch die veränderten Druckverhältnisse im linken Ventrikel, zum Teil durch eine mögliche relative Mitralinsuffizienz. Neben einer Erhöhung der Konzentration des gesamtlöslichen Eiweißes steigt die Absolutkonzentration von Myogen und L-Myosin an. Die Actomyosin-Konzentration der Vorhöfe von operierten Tieren zeigt keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Vorhöfen von Normaltieren, obwohl sie auf Grund der Mehrarbeit zu erwarten wäre. Es wäre zu überlegen, ob dies nicht auf einem methodischen Fehler beruht, der in der Unmöglichkeit der Abgrenzung von Myogen, L-Myosin und Actomyosin zu suchen wäre. Die exakt abzutrennende Fraktion III der Vorhöfe, das Myoalbumin ist sowohl relativ, wie auch absolut in höherer Konzentration im Myokard operierter Tiere zu finden.

Die Ergebnisse, die wir bei der Untersuchung von hypertrophiertem Kaninchenmyokard erhalten haben, entsprechen den histologischen Untersuchungen von Aschoff, Büchner und Mönckeberg, die feststellten, daß die Myofibrillen der hypertrophen Faser absolut und relativ vermehrt sind. Am stark hypertrophierten linken Ventrikel konnten wir eine Zunahme der kontraktilen Proteine nachweisen. In der Richtung, wenn auch nicht quantitativ, stimmen die elektrophoretischen Ergebnisse mit kjeldahlometrischen Untersuchungen unseres Labors (Nowy, Frings, Walcher, Tenderich) überein.

Die von Kovats gemachte Feststellung, wonach eine direkte Abhängigkeit der Actomyosinkonzentration von der mechanischen Aktivität eines Herzabschnittes besteht, läßt sich ohne weiteres mit unseren Ergebnissen und den Feststellungen anderer Autoren in Einklang bringen.

Zusammenfassung

Mit der Mikroelektrophorese nach Antweiler wurden 6 Monate nach der Operation Extrakte aus Vorhofmyokard, rechtem und linkem Ventrikel von 8 Kaninchen mit künstlicher Aorteninsuffizienz untersucht. Ihnen gegenübergestellt waren 11 normale Kontrollherzen.

Das in Kälte pulverisierte Myokard wurde mit Weberlösung (KCl 0,6 mol, NaHCO_3 0,04 mol, Na_2CO_3 0,01 mol) eine Stunde extrahiert. Der Extrakt wurde nach 14-stündiger Dialyse gegen eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung von der Ionenstärke μ 0,35 und einem pH von 7,4 (NaCl 0,2 mol, NaH_2PO_4 0,006 mol, Na_2HPO_4 0,048 mol) mit der Mikroelektrophorese nach Antweiler untersucht. Hierfür verwendeten wir die gleiche phosphatgepufferte Kochsalzlösung wie oben.

Es ließen sich nach einer Laufzeit der Elektrophorese von 60 Minuten (2,5 mA, 36 V) reproduzierbare Pherogramme gewinnen, die eine Aufteilung in 3 Hauptfraktionen (Myoalbumin (III), Myosin (II), Myogen (I)) aufweisen. Die einzelnen Herzabschnitte ließen sich im Pherogramm dadurch unterscheiden, daß die 3 Hauptfraktionen verschiedene mengenmäßige Verhältnisse zeigten.

Beim hypertrophischen Kaninchenherzen zeigte sich eine Zunahme der Konzentration des gesamtlöslichen Eiweißes in allen 3 untersuchten Herzabschnitten. Diese Zunahme ist eher auf eine bessere Extrahierbarkeit der Proteine als auf eine Zunahme der Gewebekonzentration zurückzuführen. Das Verhältnis der einzelnen Proteinfractionen zueinander war in den hypertrophischen Herzabschnitten verändert.

Der hypertrophierte linke Ventrikel zeigte im Gegensatz zum normalen linken Ventrikel

- a) eine absolut und prozentual deutliche Zunahme der kontraktilen Proteine (Myosinkomplex)
- b) eine absolut und prozentual deutliche Zunahme des Myoalbumins
- c) eine geringe absolute Zunahme der Myogenfraktion bei relativer Verminderung.

Beim Vergleich des rechten Ventrikels eines normalen mit einem hypertrophierten Kaninchenherzen zeigte sich nur eine geringfügige Zunahme des gesamtlöslichen Eiweißes. Das Verhältnis der einzelnen Fraktionen zueinander war kaum verändert.

In den Vorhöfen von hypertrophierten Herzen ließ sich im Vergleich zu denen von normalen Herzen eine deutliche Zunahme des gesamtlöslichen Eiweißes nachweisen. Besonders deutlich zeigte sich eine sowohl relative wie auch absolute Vermehrung des Myoalbuminanteiles.

Literatur

1. Albrecht, E.: Der Herzmuskel J. Springer
Berlin 1903
2. Antweiler, H.J.: Die quantitative Elektro- J. Springer
phorese in der Medizin Berlin 1952
3. Aschoff, L.: Zitiert n. Linzbach A. J. 314 (1947) 534
Virchows Arch. path. Anat.
4. Bailey, K. u. Biochim. biophys. Acta 1 (1947) 506
S. V. Perry:
5. Bailey, K.: Biochem. J. 43 (1948) 271
6. Bailey, K.: Biochem. J. 49 (1951)
7. Baranowski, T.: J. Biol. Chem., Baltimore 180 (1949) 535
8. Bate-Smith, E.C.: Proc. Roy. Soc. London 124 (1937) 136
9. Blasius, R.,
H. Nowy u. W. Seitz: Klin. Wschr. 31 (1953) 478
10. Büchner, F.: Verh. dtsh. Ges. Kreisl. -
Forsch. (1950) 26
Boll. Soc. ital. biol. sper. 26 (1950) 1492
11. Crepax, P.: Boll. Soc. ital. biol. sper. 26 (1950) 1492
12. Crepax, P. u.
A. Herion: Biochim. biophys. Acta 6 (1950) 54
13. Crepax, P.: Biochim. biophys. Acta 7 (1951) 87
14. Crepax, P.: Biochim. biophys. Acta 9 (1952) 385
15. Crepax, P., J. Jacob
u. J. Seideslachts: Biochim. biophys. Acta 4 (1950) 410
16. Cruck, S.: Arch. internat. physiol. 65 (1957) 97
17. Cruck, S.: Biochim. biophys. Acta 10 (1953) 630
18. Demling, L., H. Kin-
selmeier u. M. Henning: Zschr. exper. Med. 122 (1953/54) 416
19. Disteche, A.: Biochim. biophys. Acta 2 (1948) 265
20. Disteche, A.: Nature, London 164 (1949) 70
21. Disteche, A.: Biochim. biophys. Acta 10 (1953) 524
22. Dubuisson, M.: Muscular Contraction
Springfield (USA) (1954)
23. Dubuisson, M.: Arch. Internat. physiol. 51 (1941) 133
24. Dubuisson, M.: Arch. Internat. physiol. 51 (1941) 154
25. Dubuisson, M.: Experientia, Basel 2 (1946) 258
26. Dubuisson, M.: Experientia, Basel 2 (1946) 412
27. Dubuisson, M.: Experientia, Basel 3 (1947) 213

28. Dubuisson, M.:	Experientia, Basel	3 (1947)	372
29. Dubuisson, M.:	Biochim. biophys. Acta	4 (1950)	25
30. Dubuisson, M.:	Biochim. biophys. Acta	5 (1950)	489
31. Dubuisson, M.:	Biochim. biophys. Acta	5 (1950)	426
32. Dubuisson, M. u. L. Mathieu:	Experientia, Basel	4 (1948)	152
33. Dubuisson, M. u. J. Jacob:	Experientia, Basel	1 (1945)	272
34. Dubuisson, M. u. C. Fabry-Hamoir:	Experientia, Basel	6 (1950)	102
35. Dubuisson, M., A. Di- steche u. A. Debot:	Biochim. biophys. Acta	6 (1950)	97
36. Dubuisson, M. u. A. Dubuisson:	Arch. internat. physiol.	53 (1943)	308
37. Fleckenstein:	Pflügers Arch.	246 (1942)	
38. v. Fürth, O.:	Erg. Physiol.	17 (1919)	363
39. Hamoir, G.:	Experientia, Basel	5 (1947)	498
40. Jacob, J.:	Experientia, Basel	2 (1946)	110
41. Jacob, J.:	Experientia, Basel	3 (1947)	241
42. Jacob, J.:	Biochem. J. London	41 (1947)	83
43. Kirch, E.:	Virchow Arch.	291 (1933)	
44. Koväts, J.:	Nature, London	163 (1949)	606
45. Kuschinsky, G.:	Klin. Wschr.	31/32 (1947)	502
46. Kuschinsky, G. u. A. Turba:	Biochim. biophys. Acta	6 (1951)	
47. Linzbach, A. J.:	Virchows. Arch. path. Anat.	314 (1947)	534
48. Linzbach, A. J.:	Virchows. Arch. path. Anat.	318 (1950)	575
49. Linzbach, A. J.:	Klin. Wschr.	33 (1948)	
50. Linzbach, A. J.:	Verh. dtsch. Ges. Kreisl. - Forsch.	(1950)	
51. v. Metzler, X.:	Arch. Kreislaufforsch.	17 (1951)	56
52. v. Metzler, X.:	Klin. Wschr.	31 (1953)	448
53. Mommaerts, W. F. H. M.:	Biochim. biophys. Acta	4 (1950)	50
54. Nowy, H. u. W. Seitz:	Zschr. exper. Med.	126 (1955/56)	1
55. Nowy, H., R. Blasius u. O. Karl:	Zschr. exper. Med.	126 (1955/56)	12

- | | | | |
|--|---|------------|-----|
| 56. Nowy, H.,
H. D. Frings,
A. Walcher u.
L. Tenderich: | Zschr. exper. Med. | 131 (1959) | 478 |
| 57. Nowy, H.,
H. D. Frings u.
K. Rey: | Experientia, Basel | 15 (1959) | 70 |
| 58. Snellman, O. u.
M. Tenow: | Biochim. biophys. Acta | 13 (1954) | 199 |
| 59. Straub, F. B.: | Nature, London | 162 (1948) | 217 |
| 60. Szent-Györgyi, A.: | Biochim. biophys. Acta | 4 (1950) | 38 |
| 61. Szent-Györgyi, A.: | Chemistry of muscular
contraction, N. Y.
Academic Press, Inc.
Publishers | (1951) | |
| 62. Tenderich, L.: | Dissertation | (1959) | |
| 63. Weber, H. H.: | Erg. Physiol. | 36 (1934) | 109 |
| 64. Weber, H. H. u.
H. Portzehl: | Erg. Physiol. | 47 (1952) | 369 |
| 65. Weber, H. H.: | Biochim. biophys. Acta | 4 (1950) | 12 |

Herrn Privatdozenten Dr. med. H. Nowy möchte ich meinen Dank für die Überlassung der lehrreichen und interessanten Arbeit und für die Übernahme des Referates aussprechen.

Danken möchte ich Herrn Dr. med. H. D. Frings für seine Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Geboren am 8. 2. 1933 in Ogenbargen/Ostfriesland als Sohn des Dr. med. Gerhard Strenge. Nach Besuch der Volksschule in Middels legte ich im Jahre 1952 die Reifeprüfung am Ulricianum in Aurich ab. Darauf begann ich mit dem Studium der Medizin in Marburg, wo ich im Jahre 1955 die ärztliche Vorprüfung absolvierte. Die anschließenden klinischen Semester belegte ich in Freiburg, Wien und München. Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Winter 1958 an der Universität in München.

Seit dem 1. Februar 1959 arbeite ich an der Med. Poliklinik der Universität München.

